

Université de Montréal

# **ÉTUDE DU RÔLE DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA PROSTATE**

Par

Annie Dumouchel

Programme de Biologie moléculaire  
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en biologie moléculaire

Août 2005

© Annie Dumouchel, 2005



①H

506

U54

2006

1.003

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude du rôle de l'acide rétinoïque dans  
le développement de la prostate

présenté par :  
Annie Dumouchel

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Muriel Aubry, Ph.D.  
président-rapporteur

David Lohnes, Ph.D.  
directeur de recherche

Mark Featherstone, Ph.D.  
membre du jury

## RÉSUMÉ

La prostate des souris *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>* présente un épithélium stratifié résultant d'une transdifférentiation (métaplasie). Ceci suggère un rôle important des *RAR $\gamma$*  dans la différenciation et le maintien de la prostate. Notre objectif consistait à identifier les molécules impliquées dans ce phénomène.

Peu avant l'apparition de la métaplasie, l'expression de la  $\beta$ -caténine est inhibée chez les mutants *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>*, indiquant que la  $\beta$ -caténine influence la différenciation de la prostate. L'influence de l'acide rétinoïque (AR) sur la  $\beta$ -caténine de la prostate a été confirmée par l'observation d'un effet inhibiteur de l'AR sur cette molécule. Afin de vérifier si cette régulation passe par la voie canonique des Wnt, nous avons analysé l'activité Wnt dans la prostate et nous n'avons détecté aucune activité, proposant la présence d'une autre voie de régulation de la  $\beta$ -caténine par l'AR dans cette glande. Les récepteurs aux androgènes étant essentiels dans la prostate et interagissant avec la  $\beta$ -caténine, nous avons analysé l'influence de l'AR sur la  $\beta$ -caténine complexée aux récepteurs aux androgènes et l'AR ne semble pas influencer ce complexe, mais augmenter l'expression des récepteurs aux androgènes tout en inhibant leur activité. L'AR régulerait aussi le facteur de croissance IGF-I dont la présence augmente l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux androgènes en présence de la  $\beta$ -caténine.

Nos études ont montré que la  $\beta$ -caténine semble être impliquée dans la métaplasie observée chez les mutants *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>* et que l'AR aurait un effet inhibiteur sur l'activation des récepteurs aux androgènes. Ces résultats préliminaires suggèrent une nouvelle voie de régulation par les rétinoïdes.

**MOTS CLÉS :**  $\beta$ -caténine, cancer, IGF-I, récepteurs aux androgènes, récepteurs de l'acide rétinoïque, vésicules séminales, wnt.

## SUMMARY

The prostate of *RAR $\gamma$*  null mice presents stratified epithelia as a result of a transdifferentiation (squamous metaplasia). That suggests an important role for *RAR $\gamma$*  in prostate differentiation and integrity. Our objective was to identify pathways and molecules implicated in this transdifferentiation.

Expression of  $\beta$ -catenin was downregulated in *RAR $\gamma$*  null mice before the first signs of metaplasia. These results indicate an important role for  $\beta$ -catenin in the prostate differentiation. The effect of retinoic acid (RA) on  $\beta$ -catenin expression in prostate was confirmed by the observation that RA has an inhibitory effect on this molecule. To verify if this regulation could pass by the canonical Wnt pathway, we measured the activity of this pathway; no activity was detected. These observations suggest that another pathway regulates  $\beta$ -catenin in the prostate. Since androgen receptors play an important role in prostate, and interact with  $\beta$ -catenin, we analysed the influence of RA on  $\beta$ -catenin complexed with androgen receptors. Our results suggest that RA inhibits androgen receptor activity but upregulates its expression without affecting the formation of this complex. RA also regulated IGF-I which is associated with an increase in androgen receptor activity in presence of  $\beta$ -catenin.

Our studies suggest that  $\beta$ -catenin is implicated in squamous metaplasia of *RAR $\gamma$*  null mice and that RA could inhibit the androgen receptors pathway in prostate. These preliminary results suggest a new pathway regulated by retinoids.

**KEY WORDS:**  $\beta$ -catenin, cancer, IGF-I, androgen receptors, retinoic acid receptors, seminal vesicles, wnt.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>IDENTIFICATION DU JURY</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ</b>	<b>iii</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>iv</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>v</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>viii</b>
<b>ABBREVIATIONS</b>	<b>ix</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>xi</b>
<b>CHAPITRE 1. Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Le métabolisme de la vitamine A</b>	<b>2</b>
1.1.1 L'apport, le stockage et la mobilisation de la vitamine A.....	2
1.1.2 Synthèse de l'acide rétinoïque .....	3
1.1.2.1 Du rétinol au rétinaldéhyde.....	3
1.1.2.2 Du rétinaldéhyde à l'acide rétinoïque.....	3
1.1.3 Catabolisme de l'acide rétinoïque.....	5
1.1.4 Les protéines de liaison aux rétinoïdes.....	7
1.1.4.1 Les CRBPs.....	7
1.1.4.2 Les CRABPs .....	8
<b>1.2 Les récepteurs aux rétinoïdes</b>	<b>9</b>
1.2.1 Les RARs et les RXRs .....	9
1.2.2 La structure des RARs et des RXRs .....	10
1.2.3 La liaison des RARs au ligand et à l'ADN.....	11
1.2.4 La répression de la transcription par les RARs.....	12
1.2.5 L'activation de la transcription par les RARs.....	14
1.2.6 La rencontre avec d'autres voies de signalisation .....	17
<b>1.3 Le rôle des rétinoïdes au cours du développement</b>	<b>18</b>
1.3.1 L'insuffisance et l'excès d'acide rétinoïque.....	18
1.3.2 L'invalidation génique des RARs chez la souris .....	18

<b>1.4 La prostate</b>	<b>20</b>
1.4.1 L'anatomie, l'histologie et la physiologie de la prostate	20
1.4.2 La croissance et la différenciation de la prostate	21
1.4.2.1 Le rôle des androgènes	22
1.4.2.2 Les interactions mésenchyme-épithélium dans le développement de la prostate	23
1.4.2.3 Le rôle des facteurs de croissance dans les interactions mésenchyme-épithélium	24
<b>1.5 Le cancer de la prostate</b>	<b>26</b>
1.5.1 Épidémiologie	26
1.5.2 Initiation et développement	26
1.5.3. Facteurs génétiques et moléculaires	27
1.5.4 La $\beta$ -caténine dans la voie canonique des Wnt	28
1.5.4.1 La signalisation extracellulaire	28
1.5.4.2 La signalisation intracellulaire	29
<b>1.6 L'acide rétinoïque et la prostate</b>	<b>32</b>
1.6.1 L'acide rétinoïque dans le développement et le cancer de la prostate	32
1.6.2 L'acide rétinoïque et les androgènes	33
1.6.3 L'acide rétinoïque et la $\beta$ -caténine dans le cancer de la prostate	33
<b>1.7 Hypothèse</b>	<b>35</b>
<b>CHAPITRE 2. Matériels et méthodes</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Animaux</b>	<b>37</b>
<b>2.2 Traitement des animaux</b>	<b>37</b>
<b>2.3 Immunohistochimie</b>	<b>37</b>
<b>2.4 Hybridation in situ</b>	<b>38</b>
<b>2.5 Coloration au X-Gal</b>	<b>39</b>
<b>2.6 Constructions plasmidiques</b>	<b>39</b>
<b>2.7 Culture cellulaire et transfections</b>	<b>39</b>
<b>2.8 Extraits totaux de protéines</b>	<b>40</b>
2.8.1 À partir de cellules en culture	40



2.8.2 À partir de prostates .....	41
<b>2.9 Coimmunoprécipitation .....</b>	<b>41</b>
 <b>CHAPITRE 3. Résultats .....</b>	<b>42</b>
3.1 Progression de la métaplasie chez les souris $RAR\gamma^{-/-}$ .....	42
3.2 Expression de la $\beta$ -caténine chez les souris $RAR\gamma^{-/-}$ .....	42
3.3 Effet de l'AR sur l'expression de la $\beta$ -caténine .....	48
3.4 Site d'activité biologique de l'AR .....	50
3.5 Activité de la voie canonique des Wnt dans la prostate .....	50
3.6 Évaluation du modèle cellulaire LNCaP .....	52
3.7 Influence de l'AR sur les récepteurs aux androgènes, $\beta$ -caténine et leur complexe .....	54
3.8 Expression de IGF-I dans les souris $RAR\gamma^{+/-}$ .....	58
 <b>CHAPITRE 4. Discussion .....</b>	<b>62</b>
4.1 Le phénotype métaplasique débute chez les souris $RAR\gamma^{+/-}$ âgées entre deux et trois semaines .....	63
4.2 Diminution de l'expression de la $\beta$ -caténine dans la prostate des souris $RAR\gamma^{+/-}$ .....	64
4.3 Faible activité de la voie canonique des Wnt dans la prostate .....	66
4.4 Influence de l'AR sur la $\beta$ -caténine complexée aux récepteurs aux androgènes .....	67
4.5 Diminution de l'expression de IGF-I chez les souris $RAR\gamma^{+/-}$ .....	71
4.6 Perspectives futures .....	72
4.7 Conclusion .....	74
 <b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>75</b>

## LISTE DES FIGURES

### **CHAPITRE 1. Introduction**

Figure 1-1	Le métabolisme de la vitamine A .....	4
Figure 1-2	La structure modulaire des récepteurs à l'acide rétinoïque .....	10
Figure 1-3	La régulation transcriptionnelle par les récepteurs à l'acide rétinoïque .	13
Figure 1-4	Schéma du tractus uro-génital mâle de la souris naissante .....	22
Figure 1-5	Schéma de la voie canonique des Wnt.....	31

### **CHAPITRE 3. Résultats**

Figure 3-1	Phénotype des vésicules séminales de souris $RAR\gamma^{-/-}$ .....	44
Figure 3-2	Expression de la $\beta$ -caténine dans la prostate et les vésicules séminales des souris $RAR\gamma^{-/-}$ .....	47
Figure 3-3	Effet de l'acide rétinoïque sur l'expression de la $\beta$ -caténine.....	49
Figure 3-4	Analyse du site d'activité des récepteurs à l'acide rétinoïque .....	51
Figure 3-5	Évaluation de la pertinence du modèle cellulaire LNCaP.....	53
Figure 3-6	Effet de l'acide rétinoïque sur la $\beta$ -caténine, les récepteurs aux androgènes et leur complexe .....	55
Figure 3-7	Expression de l'ARNm de IGF-I dans les mutants $RAR\gamma^{-/-}$ .....	57
Figure 3-8	Expression de IGF-I dans la prostate et les vésicules séminales des souris $RAR\gamma^{-/-}$ .....	60

### **CHAPITRE 4. Discussion**

Figure 4-1	Modèle de régulation par l'acide rétinoïque .....	70
------------	---	----

## ABBREVIATIONS

Aa	Acide aminé
ABP	Protéines liant les androgènes
ADH	Alcool déshydrogénase
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
APC	Adénomatous polyposis coli
AR	Acide rétinoïque
ARAT	Acétyl coenzyme A : Rétinol acétyltransférase
BHP	Hyperplasie bénigne de la prostate
CARM	Coactivateur arginine méthyltransférase
CBP	Protéines liant CREB
CDK	Kinase dépendante du cycle cellulaire
CK	Caséine kinase
CRABPs	Protéine de liaison à l'acide rétinoïque cytoplasmique
CRBPs	Protéine de liaison au rétinol cytoplasmique
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DHT	Dihydrotestostérone
DR	Répétition directe
Dvl	Dishevelled
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FSH	Hormone folliculo-stimulante
Fz	Frizzled
GNRH	Hormone de relâchement des gonadotropines par l'hypothalamus
GSK	Kinase glycogène synthase
HAT	Acétyltransférase d'histones
HDAC	Déacétylase d'histones
HGF	Facteur de croissance hépatocytaire
HLH	Hélice-boucle-hélice
HRE	Élément de réponse aux hormones
IGF	Facteur de croissance ressemblant à l'insuline
LBD	Domaine de liaison au ligand

LEF	Protéine liant l' <i>enhancer</i> lymphoïde
LH	Hormone lutéinisante
LRAT	Lecithine : Rétinol acétyltransférase
MAPK	MAP kinase
NCoR	Corépresseur des récepteurs nucléaires
NR	Récepteurs nucléaires
Pb	Paire de bases
P/CAF	Facteur associé à CBP/p300
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3 kinase
PSA	Antigène spécifique à la prostate
RA	Récepteurs aux androgènes
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque
RARE	Élément de réponse aux RARs
RALDH	Rétinaldéhyde déshydrogénase
RBP	Protéine de liaison au rétinol
REH	Retinyl ester hydrolases
RXR	Récepteur X aux rétinoïdes
SDR	<i>Short-chain deshydrogenase/reductase</i>
SMRT	Méiateur silencieux pour les récepteurs aux rétinoïdes et thyroïdiens
SRC	Coactivateurs des récepteurs thyroïdiens
TAF	Facteurs associés aux protéines liant la boîte TATA
TCF	Facteur T-cellulaire
TGM	Tractus génital mâle
TR	Récepteurs thyroïdiens
TRAP/DRIP	Thyroid receptor-associated protein/vitamin D interacting Proteins
UGS	Sinus urogénital
VAD	Déficiencia en vitamina A
VDR	Récepteur à la vitamine D <sub>3</sub>

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier d'abord mon directeur de recherche, Dr David Lohnes, pour son enseignement au cours de mes études graduées. Je lui suis reconnaissante de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de participer à ses travaux de recherche passionnants. Je voudrais surtout le remercier pour m'avoir permis de développer mon potentiel au niveau de la recherche scientifique et de m'avoir laissé exprimer et appliquer mes idées, sous sa précieuse supervision.

Je voudrais exprimer mon extrême reconnaissance à mes parents qui m'ont encouragé et supporté tout au long de mes études. J'ai toujours pu compter sur leur soutien et leurs conseils dans les moments d'incertitude et de leur enthousiasme lors des réussites. Je les remercie énormément.

Je voudrais remercier également mon conjoint Marc-André Brazeau pour sa constante présence. Ses encouragements m'ont permis d'aller toujours plus loin.

## Chapitre 1

### ***Introduction***

## 1.1 Le métabolisme de la vitamine A

La vitamine A est une molécule lipophile essentielle pour une multitude de processus développementaux comme la vision, la croissance, la formation des axes embryonnaires et la maintenance des tissus épithéliaux chez l'adulte. La vitamine A ne possède pas une activité biologique en soi, mais son action est plutôt médiée par ses dérivées. Leur nécessité a été démontrée très tôt par des études chez le rat montrant des changements dans la morphologie des tissus en carence de vitamine A (Wolbach *et al.*, 1925). Plusieurs transformations ont lieu dans l'organisme afin d'arriver à une forme active de la vitamine A.

### 1.1.1 L'apport, le stockage et la mobilisation de la vitamine A

La vitamine A doit d'abord être apportée par l'alimentation car notre organisme est incapable de la synthétiser. Les précurseurs de la vitamine A peuvent provenir de sources animales (esters de rétinyl et rétinol) et végétales (caroténoïdes, principalement la  $\beta$ -carotène). Dans la lumière du petit intestin, les esters de rétinyl sont hydrolysés en rétinol avant de passer dans l'entérocyte. Les caroténoïdes, une fois absorbés par la muqueuse intestinale, sont convertis en rétinaldéhyde avant d'être réduits en rétinol (Gottesman *et al.*, 2001). Ce rétinol issu de ces deux sources est ensuite réestérifié dans l'entérocyte par l'action de deux enzymes, LRAT et ARAT. Les esters de rétinyl résultants sont empaquetés avec d'autres lipides dans les chylomicrons qui sont déversés dans le système lymphatique afin de se rendre au foie. Les esters de rétinyl des chylomicrons sont par la suite recrutés par les hépatocytes où ils subiront une hydrolyse en rétinol qui pourra ensuite suivre deux voies : (1) être sécrété dans la circulation sanguine ou (2) être emmagasiné dans des cellules spécialisées du foie (figure1-1).

Quand le sang est pauvre en rétinol, les esters de rétinyl sont relâchés du foie en rétinol par l'action des rétinyl ester hydrolases (REH). Le rétinol semble être maintenu soluble par les RBP et être acquis par la plupart des tissus sous cette forme complexée. Toutefois, les souris nulles pour le gène codant pour RBP ne semblent pas présenter d'anomalies sévères si ce n'est qu'un retard de la vision et une dépendance de la présence de la vitamine A dans l'alimentation (Quadro *et al.*, 1999). On retrouve aussi dans le sang en faible quantité, l'acide rétinoïque (AR) provenant de

l'alimentation lié à l'albumine, ce qui lui permet de pénétrer dans la cellule en le maintenant soluble (Gottesman *et al.*, 2001).

### **1.1.2 Synthèse de l'acide rétinoïque**

Pour avoir une activité biologique, le rétinol doit être oxydé d'abord en rétinaldéhyde et ensuite en acide rétinoïque. C'est cette dernière molécule qui va se lier à ses récepteurs et activer la transcription de ces gènes cibles.

#### **1.1.2.1 Du rétinol au rétinaldéhyde**

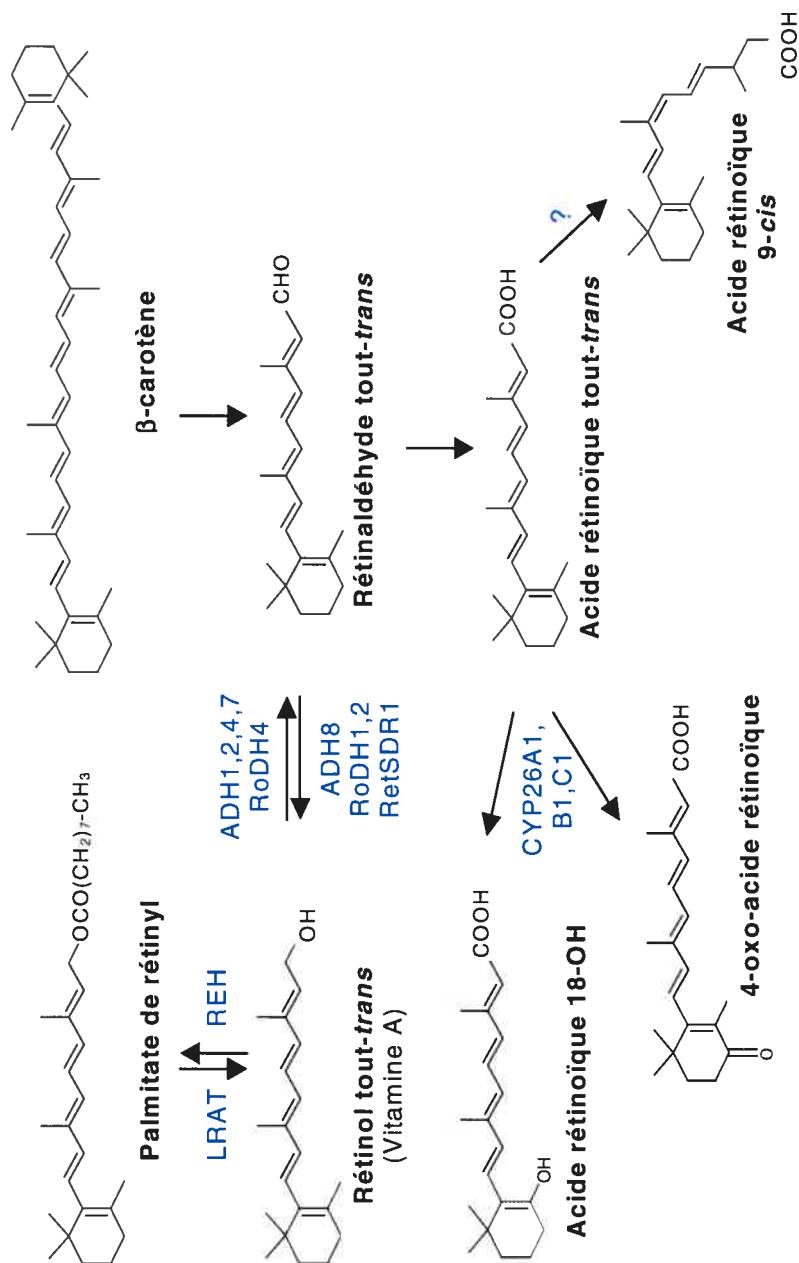
La première oxydation pour passer du rétinol au rétinaldéhyde est réversible et est permise par l'action d'une famille d'enzymes peu spécifiques appelée alcool (rétinol) déshydrogénases (ADH). Ce sont des métalloenzymes possédant un doigt de zinc dimérique et qui requiert le NAD<sup>+</sup> pour oxyder une variété d'alcools cycliques (Jornvall *et al.*, 1995). Chez les mammifères, on retrouve ADH1, ADH2 et ADH4. Les souris mutantes déficientes en ADH1 montrent une croissance pré-natale et post-natale normales dans des conditions standards de laboratoire, mais celles mutantes pour ADH4 sont carencées en vitamine A, ce qui confirme le fait que ADH4 est la plus active *in vivo* et que son patron d'expression est le plus étendu (Yang *et al.*, 1994; Deltour *et al.*, 1997; Haselbeck *et al.*, 1997a; Haselbeck *et al.*, 1997b; Haselbeck *et al.*, 1997c; Quadro *et al.*, 1999). Il est par contre à noter qu'aucune de ces enzymes n'est indispensable (Deltour *et al.*, 1999a; Deltour *et al.*, 1999b).

L'oxydation du rétinol tout-*trans* en rétinaldéhyde tout-*trans* peut être aussi catalysée *in vivo* par une famille d'enzymes microsomaux SDR (*short-chain deshydrogenase/reductase*). Ces enzymes ne requièrent pas de zinc pour leur activité. Les rétinol déshydrogénases microsomaux reconnaissent le rétinol tout-*trans* lié à CRBP-I, une protéine de liaison cellulaire, dont les différents rôles seront discutés plus loin, et requiert le NADP<sup>+</sup> comme accepteur d'électrons.

#### **1.1.2.2 Du rétinaldéhyde à l'acide rétinoïque**

La réaction enzymatique permettant la conversion du rétinaldéhyde en acide rétinoïque (AR) est irréversible et est permise par l'action de quelques enzymes très spécifiques de la famille des aldéhydes déshydrogénases (ALDH) (Duester, 2000). ALDH1, retrouvé chez l'humain, possède comme homologue Adh2 chez la souris





**Figure 1-1. Le métabolisme de la vitamine A.**

ADH, alcool déshydrogénase; LRAT, lécitine:rétinol acétyl transférase; RALDH, rétinaldéhyde déshydrogénase; REH, rétinyl ester hydrolase; RetSDR, rétinol short-chain deshydrogénase/réductase; RoDH, rétinol déshydrogénase. Voir texte pour les détails.

et RALDH ou RalDH1 chez le rat. Ces dernières catalysent l'oxydation NAD-dépendante du rétinaldéhyde tout-*trans* et 9-*cis* en acide rétinoïque tout-*trans* et 9-*cis* respectivement.

RALDH2 est une autre enzyme de la famille des ALDH, mais qui ne possède que le rétinaldéhyde tout-*trans* comme substrat contrairement à ALDH1 (Zhao *et al.*, 1996). L'activité catalytique de RALDH2 pour son substrat est 15 fois plus élevée que ALDH1 pour le même substrat (Wang *et al.*, 1996). Cette différence est due à une boucle du site actif de RALDH2 qui dispose le rétinaldéhyde tout-*trans* d'une façon différente comparativement à ALDH1 (Lamb *et al.*, 1999). Appuyé par les résultats du *knockout*, RALDH2 est une enzyme essentielle à la survie embryonnaire, permettant la production de l'AR nécessaire pour la croissance et le développement. En effet, la souris *Raldh*<sup>-/-</sup> ne survie pas au-delà du stade embryonnaire 10.5 (E10.5) et démontre une déficience presque totale en AR. L'administration d'AR à la mère pendant la gestation permet de corriger le phénotype du mutant (Niederreither *et al.*, 1999), démontrant que RALDH2 est la principale enzyme requise spécifiquement pour la génération de l'AR dans l'embryon.

Une troisième enzyme est aussi capable de synthétiser l'AR. ALDH6 (RALDH3) est semblable à RALDH1 et RALDH2 et son expression est restreinte à l'œil. En effet, RALDH3 est présente dans la rétine ventrale et dorsale, dans l'épithélium pigmentaire et dans la vésicule optique. Les mutants nuls *Raldh3* possèdent des malformations au niveau des régions oculaires et nasales et meurent à la naissance (Dupé *et al.*, 2003). Toutefois, l'administration d'AR à la mère prévient certaines malformations. Il a été suggéré que RALDH3 pourrait fournir assez d'AR pour le développement de la rétine lorsque RALDH1 est manquant (Fan *et al.*, 2003). Par contre, la rétine des souris *Raldh3*<sup>-/-</sup> semble normale, ce qui suggère que RALDH1 pourrait compenser la perte de RALDH3 (Dupé *et al.*, 2003). Ces études suggèrent que RALDH3 est critique pour le développement nasal, mais pas dans le développement de la rétine.

### **1.1.3 Catabolisme de l'acide rétinoïque**

Les processus développementaux sont très sensibles à un excès ou un manque de rétinoïdes. La distribution de l'AR se doit donc d'être strictement régulé. Ce contrôle est assuré par la balance des enzymes responsables de sa synthèse et de sa dégradation. La synthèse d'AR amène soit l'activation de ses récepteurs ou son

inactivation et sa dégradation. P450RAI (CYP26) est une famille d'enzymes du cytochrome P450 qui métabolise spécifiquement l'AR. Cette famille comprend CYP26A1 (Ray *et al.*, 1997), B1 (MacLean *et al.*, 2001) et C1 (Taimi *et al.*, 2004). Ces enzymes dégradent l'AR en dérivés 4-hydroxy-AR, 18-hydroxy- AR puis en 4-oxo-AR qui sont plus polaires (White *et al.*, 1997).

CYP26A1 métabolise l'AR tout-*trans* et a peu d'effet sur l'AR 9-*cis* et 13-*cis*. Cette enzyme joue un rôle primordial dans le processus d'inactivation de l'AR car les mutants *Cyp26a1*<sup>-/-</sup> possèdent des anomalies sévères. D'abord, les embryons décèdent vers la mi-fin de la gestation. Les anomalies observées rappellent celles notées dans les cas de tératogénèse provoquée par l'administration exogène d'AR et incluent l'exencéphalie (fermeture partielle du tube neural antérieur), la spina bifida (fermeture incomplète du neuropore postérieur), la troncation de la partie postérieure de l'embryon, ainsi que des transformations vertébrales postérieures affectant la région cervicale. L'AR dans ces mutants diffuserait vers les régions adjacentes sensibles à l'AR et en affecterait le développement. Pour appuyer cette hypothèse, une étude a démontré que l'inactivation des deux isoformes *RAR*γ1 et 2 combiné à celle de *Cyp26a1*, rétablit le développement normal de ces double mutants (Abu-Abed *et al.*, 2003). Par contre, cette expérience ne démontre pas que les malformations observées chez les mutants *Cyp26a1*<sup>-/-</sup> ne sont pas dues à l'absence de signalisation par les métabolites résultant de la dégradation de l'AR par cette enzyme. Afin de vérifier cette supposition, Niederreither *et al.* ont émis comme hypothèse que si CYP26A1 protège l'embryon contre un excès d'AR, le phénotype du mutant *Cyp26a1*<sup>-/-</sup> devrait être atténué par une mutation diminuant la synthèse d'AR, mais amplifié si les métabolites générés par CYP26A1 sont essentiels (Niederreither *et al.*, 2002). Cette équipe a donc généré des souris double mutantes *Cyp26a1*<sup>-/-</sup> *Raldh2*<sup>+/-</sup>, qui survivent plus longtemps que les souris *Cyp26a1*<sup>-/-</sup>. Ensemble, ces résultats démontrent que CYP26A1 est une enzyme essentielle prévenant les effets tératogènes d'une distribution ectopique d'AR et que les dérivés polaires entraînés par la dégradation de l'AR par cette enzyme sont biologiquement inactifs. De plus, ces derniers résultats suggèrent que l'expression de CYP26A1 et de RALDH2 génère des concentrations localisées d'AR qui doivent être finement régulées afin de permettre le développement normal.

Étonnamment, les membres des souris *Cyp26a1*<sup>-/-</sup> sont normaux, ce qui suggère la présence d'une autre enzyme dans les membres pouvant dégrader l'AR en absence

de CYP26A1. Une autre enzyme de la famille du cytochrome P450 a été identifiée, CYP26B1 (Nelson, 1999; MacLean *et al.*, 2001). CYP26B1 est retrouvée dans la région distal du bourgeon des membres en développement, et les souris *Cyp26b1*<sup>-/-</sup> démontrent de sévères malformations des membres (meromelia) (Yashiro *et al.*, 2004) comme un défaut dans l'établissement de l'axe proximo-distal, une augmentation de l'apoptose dans la région proximale et un retard dans la maturation des chondrocytes. Ces malformations rappellent celles observées lors d'un excès d'AR. Yashiro *et al.* ont proposé que l'AR agirait comme un morphogène afin d'établir l'identité proximo-distal des membres en fonction de la concentration d'AR déterminée par la synthèse d'AR par RALDH2 dans le tronc et la dégradation dans la région distale des membres où CYP26B1 est retrouvée (Yashiro *et al.*, 2004).

CYP26C1 semble aussi avoir un rôle dans le catabolisme de l'AR ou de ses dérivés et a récemment été cloné de l'humain et de la souris (Tahayato *et al.*, 2003; Taimi *et al.*, 2004). Malgré le fait que CYP26C1 possède des caractéristiques communes avec CYP26A1 et B1, il possède une activité catalytique unique en métabolisant l'AR 9-*cis* en AR 4-hydroxy-9-*cis* et 4-oxo-9-*cis* (Montplaisir *et al.*, 2002; Chithalen *et al.*, 2002; Taimi *et al.*, 2004).

#### **1.1.4 Les protéines de liaison aux rétinoïdes**

Afin d'être maintenus soluble, les rétinoïdes doivent être liés à des protéines en milieu aqueux. Plusieurs protéines de liaison aux rétinoïdes ont été identifiées dans les espèces supérieures. On retrouve les protéines de liaison cellulaire au rétinol de type I et II (CRBP-I et CRBP-II) et les protéines de liaison à l'AR de type I et II (CRABP-I et CRABP-II) qui sont intracellulaires contrairement à RBP et IRBP qui sont extracellulaires. Plusieurs fonctions pour les protéines de liaison intracellulaires ont été proposées.

##### **1.1.4.1 Les CRBPs**

CRBP-I et CRBP-II interagissent avec le rétinol et le rétinaldéhyde tout-*trans*. Malgré le fait que les enzymes responsables du métabolisme des rétinoïdes peuvent utiliser les rétinoïdes libres comme substrat, plusieurs évidences montrent que les protéines de liaison aux rétinoïdes permettraient l'accès de leurs ligands à des enzymes particuliers et restreindraient l'accès pour d'autres. D'abord, CRBP-I facilite l'estérification du rétinol par l'enzyme LRAT tandis que l'absence de rétinol lié à

CRBP-I stimule l'hydrolyse d'esters de rétinyl (Ong *et al.*, 1988). CRBP-I peut aussi présenter ses ligands (rétinol et rétinaldéhyde) à des déshydrogénases particulières par des interactions protéine-protéine spécifiques (Napoli, 2000). Malgré l'importance de ces rôles, CRBP-I n'est pas essentiel pour la survie. En effet, les mutants *Crbp-I<sup>-/-</sup>* sont normaux lorsque soumis à une diète riche en vitamine A, mais montrent une déficience partielle dans l'apport en rétinoïdes et le stockage des esters de rétinyl lorsque soumis à une carence de vitamine A (Ghyselinck *et al.*, 1999).

CRBP-II possède des rôles similaires à CRBP-I dans le métabolisme des rétinoïdes, mais serait aussi impliqué dans les premières étapes de l'absorption intestinale du rétinol à partir de la nourriture. Sa localisation appuie ce dernier rôle car l'expression de CRBP-II est restreinte au petit intestin contrairement à CRBP-I qui est exprimé dans plusieurs tissus chez l'adulte, particulièrement dans le foie, les reins et les organes reproducteurs (Gustafson *et al.*, 1993). De plus, la surexpression de CRBP-II dans les cellules Caco-2 permet d'augmenter l'apport et l'estérification du rétinol (Levin, 1993). CRBP-II semble avoir un rôle plus crucial que CRBP-I car les mutants *Crbp-II<sup>-/-</sup>* meurent à la naissance lors d'une déficience en vitamine A pendant la gestation (Zhang *et al.*, 2002). Lorsque que les souris *Crbp-II<sup>-/-</sup>* sont soumises à une alimentation riche en AR, elles semblent normales et fertiles, mais possèdent une déficience dans le stockage hépatique du rétinol (réduction de 40%) (Ghyselinck *et al.*, 1999; E X *et al.*, 2002). L'existence d'une redondance fonctionnelle entre ces deux protéines pourra éventuellement être démontrée par l'obtention du double mutant.

#### 1.1.4.2 Les CRABPs

Deux protéines cytoplasmiques liant avec une grande affinité l'AR tout-*trans* ont été identifiées, CRABP-I et CRABP-II. En plus de maintenir l'AR sous forme soluble dans le cytosol, CRABP-I semble stimuler la formation de métabolites polaires à partir de l'AR en utilisant CRABP-I-AR comme substrat des enzymes microsomales comme CYP26 (Fiorella *et al.*, 1991). Mais CRABP-I ne peut pas jouer un rôle crucial dans ce dernier mécanisme, car les mutants *Crabp-I<sup>-/-</sup>* se développent normalement et sont fertiles (Gorry *et al.*, 1994). En plus de posséder les mêmes rôles que CRABP-I, il a été suggéré que CRABP-II puisse agir comme un régulateur transcriptionnel dans la signalisation par l'AR. CRABP-II peut s'associer avec RAR $\alpha$  et RXR $\alpha$  de façon ligand-indépendante et le complexe peut lier l'élément de réponse spécifique de RAR-RXR et augmenter la transactivation en présence de rétinoïdes (Delva *et al.*, 1999). Ce dernier

rôle n'est pas essentiel puisque les mutants *Crabp-II<sup>-/-</sup>* ne démontrent pas de phénotype sévère (Lampron *et al.*, 1995). Afin d'établir s'il existe une redondance fonctionnelle entre ces deux protéines, des doubles mutants ont été générés. Les souris *Crabp-I/Crabp-II* sont généralement normales, mais avec un taux de polydactylie des membres antérieurs plus élevé (Lampron *et al.*, 1995). La caractérisation de ces mutants a permis d'établir que le métabolisme de l'AR ne nécessite pas la présence d'aucune de ces protéines.

## 1.2 Les récepteurs aux rétinoïdes

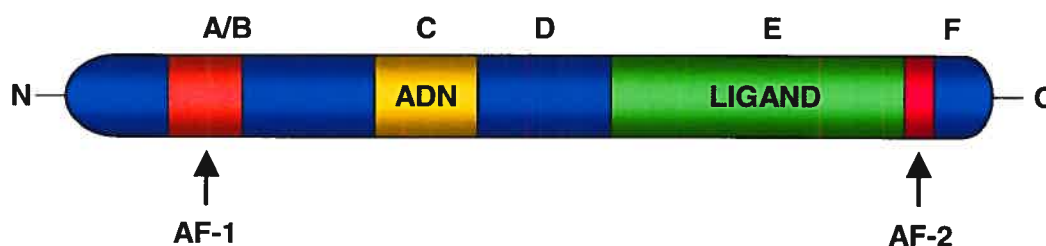
Les récepteurs aux rétinoïdes font partie de la grande famille des récepteurs nucléaires comprenant, entre autres, les récepteurs stéroïdiens, thyroïdiens et à la vitamine D<sub>3</sub>. Deux classes de récepteurs aux rétinoïdes peuvent médier l'action des rétinoïdes, les RARs (récepteurs à l'acide rétinoïque) et les RXRs (récepteurs X aux rétinoïdes).

### 1.2.1 Les RARs et les RXRs

Les RARs et les RXRs possèdent trois sous-types,  $-\alpha$ ,  $-\beta$  et  $-\gamma$  codés par trois gènes différents disposés sur trois chromosomes (Mattei *et al.*, 1991; Dollé *et al.*, 1994). Chaque gène *RAR* et *RXR* code pour de multiples isoformes : *RAR $\alpha$ 1* et 2, *RAR $\beta$ 1* à 4, *RAR $\gamma$ 1* et 2, *RXR $\alpha$  1* et 2, *RXR $\beta$ 1* et 2 et finalement, *RXR $\gamma$ 1* et 2. Ces isoformes sont générées par un épissage alternatif et par l'usage de promoteurs différents et se distinguent entre elles par leur extrémité N-terminale (Leid *et al.*, 1992). La diversité et l'étendue des réponses de la signalisation par l'AR sont dues non seulement à l'existence d'une multitude d'isoformes des différents récepteurs, mais aussi aux combinaisons possibles entre les RARs et RXRs sous forme d'hétérodimères (Bollag, 1996). Les RARs et les RXRs sont exprimés spécifiquement dans certains tissus adultes, à l'exception de *RAR $\alpha$*  et *RXR $\beta$*  dont l'expression est étendue. Chez l'embryon, le patron d'expression de *RAR $\beta$*  et *RAR $\gamma$*  varie en fonction du stade développemental (Mangelsdorf *et al.*, 1994). Le patron d'expression des différents RARs sera abordé en détail plus loin.

### 1.2.2 La structure des RARs et des RXRs

Les RARs et les RXRs possèdent tous une structure composée de six différents domaines, nommés de A à F basé leur homologie entres eux et avec la superfamille des récepteurs nucléaires (Aranda *et al.*, 2001). Chacun de ces domaines possède des fonctions différentes qui sont conservées si on les interchange entre eux (figure 1-2).



**Figure 1-2. La structure modulaire des récepteurs à l'acide rétinoïque.**

Voir texte pour les détails.

D'abord, la région A/B est localisée du côté N-terminal et elle est la plus variable autant au niveau de la longueur que de la séquence. Cette région comprend un domaine de transactivation ligand-indépendant AF-1 qui est requis pour la pleine activité transcriptionnelle des RARs, mais il y a une synergie avec le domaine de transactivation AF-2 ligand-dépendant retrouvé du côté C-terminal des RARs (Nagpal *et al.*, 1993). Le domaine AF-1 a déjà été soupçonné de jouer un rôle dans la reconnaissance de gènes cibles spécifiques (Tora *et al.*, 1988; Nagpal *et al.*, 1992), mais les mutants *RARs* suggèrent une redondance fonctionnelle de ces récepteurs entres-eux. Le domaine A/B contient plusieurs sites consensus de phosphorylation ciblés par des kinases sérine-dépendantes, comme les MAPKs, entres autres (Rochette-Egly, 2003), coopérant avec le ligand pour augmenter l'activation transcriptionnelle en facilitant le recrutement de coactivateurs ou de composants de la machinerie transcriptionnelle.

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) est compris dans la région C et est très conservé parmi les trois types de RARs. Ce domaine possède deux motifs en doigt de

zinc correspondant au cœur du DBD, deux hélices  $\alpha$  et une extension –COOH terminale et est responsable de la spécificité de reconnaissance des séquences nucléotidiques (appelées élément de réponse à l'AR ou RARE), localisées dans la région promotrice des gènes cibles (Evans *et al.*, 1988).

La région E est également bien conservée entre les RARs et les RXRs et contient le domaine de liaison au ligand (LBD). En plus de lier le ligand, cette région est responsable de la dimérisation des récepteurs, de l'activation transcriptionnelle ligand-dépendante par le domaine AF-2, de l'interaction avec les corégulateurs et de la translocation au noyau (Forman *et al.*, 1989; Nagpal *et al.*, 1992). Le LBD est formé de 12 hélices- $\alpha$  numérotées de H1 à H12 (Moras *et al.*, 1998). Le LBD est replié en trois couches d'hélices antiparallèles. La couche centrale est entourée de deux autres hélices, ce qui forme une cavité principalement hydrophobique, la cavité de liaison du ligand.

Le domaine D ou région charnière (*hinge*), est situé entre le DBD et le LBD et est bien conservé entre les RARs et les RXRs dans une espèce donnée. Ce domaine permet la rotation du DBD qui est nécessaire afin de maximiser les contacts entre les régions responsables de la dimérisation des deux récepteurs (Mader *et al.*, 1993).

La fonction du domaine F carboxy-terminal qui est totalement différent entre les RARs n'a pas encore été définie et est absent chez les RXRs. Ce domaine serait soumis à la phosphorylation chez les RARs (Rochette-Egly *et al.*, 1997). De récentes études suggèrent que certains résidus de RAR $\alpha$  pourraient être phosphorylés par la kinase c-Jun menant à l'ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Srinivas *et al.*, 2005).

### **1.2.3 La liaison des RARs au ligand et à l'ADN**

Les RARs sont capables de lier l'AR tout-*trans* et 9-*cis* tandis que les RXRs ne peuvent lier que l'AR 9-*cis*. La structure cristallographique des récepteurs nucléaires a fourni une information sur l'importance du domaine de transactivation AF-2 ligand-dépendant. En effet, la liaison du ligand amène un changement de conformation de l'hélice H12 qui contient le domaine AF-2. En absence de ligand, l'hélice H12 forme une projection loin du LBD (Bourguet *et al.*, 1995). Cependant, la liaison du ligand au récepteur permet à l'hélice H12 de refermer la cavité de liaison au ligand comme une trappe à souris (Renaud *et al.*, 1995). Ce changement de conformation lors de la



liaison au ligand semble générer une surface hydrophilique propice au recrutement de coactivateurs (Moras *et al.*, 1998).

Les récepteurs nucléaires contrôlent l'activité de gènes spécifiques par la liaison de leur DBD à de courtes séquences d'ADN appelées éléments de réponse aux hormones (HRE), généralement retrouvés dans la région promotrice des gènes cibles. Cependant, il a été trouvé que les sites de liaison des RARs possèdent leur propre organisation, les éléments de réponse à l'AR (RARE) (Sucov *et al.*, 1990; de The *et al.*, 1990; Hoffmann *et al.*, 1990). Les RAREs consistent en des répétitions directes de deux motifs de séquence PuG(G/T)TCA(X). Les espacements entre les deux motifs sont habituellement de deux ou cinq paires de bases (pb), noté DR2 ou DR5, mais on retrouve aussi des RAREs dont les motifs sont séparés par une pb (DR1) (Umesono *et al.*, 1991). Sur DR2 et DR5, RXR occupe le motif en 5' et son partenaire RAR lie le motif en 3' tandis que le contraire est observé sur DR1 (Chambon, 1996), ce qui rend impossible l'activation des récepteurs. On retrouve des RAREs dans la région promotrice d'une multitude de gènes régulés par l'AR mais aussi dans le promoteur des trois gènes *RARs*. Cette auto-induction pourrait mener à une amplification du signal par les rétinoïdes (Sucov *et al.*, 1990; Leroy *et al.*, 1991; Lehmann *et al.*, 1992). La liaison spécifique des RARs aux RAREs nécessite la liaison en hétérodimère avec des récepteurs orphelins, les RXRs (Kliwer *et al.*, 1992).

Selon la théorie, les hétérodimères existent en quatre états : les deux récepteurs inoccupés, RXR ou le partenaire occupé seulement et les deux récepteurs occupés. L'hétérodimère RXR : RAR est de type non-permissif, tout comme TR : RXR et VDR : RXR, donc la nécessité de la liaison du ligand à RXR pour l'activation est abolie. La formation de l'hétérodimère RXR : RAR empêche RXR de lier l'AR 9-*cis*, donc RXR est considéré comme un partenaire silencieux.

#### **1.2.4 La répression de la transcription par les RARs**

Les RARs possèdent la particularité de pouvoir gérer différents groupes de cofacteurs qui peuvent activer ou réprimer la transcription lors de la liaison du ligand. En absence de ligand, l'hétérodimère RXR : RAR se lie à la chromatine et facilite le recrutement de corépresseurs, ce qui permet de conserver la chromatine dans un état condensé, donc silencieux (figure 1-3). Le corépresseur des récepteurs nucléaires (NCoR) a été identifié comme étant un corépresseur des RARs et des récepteurs

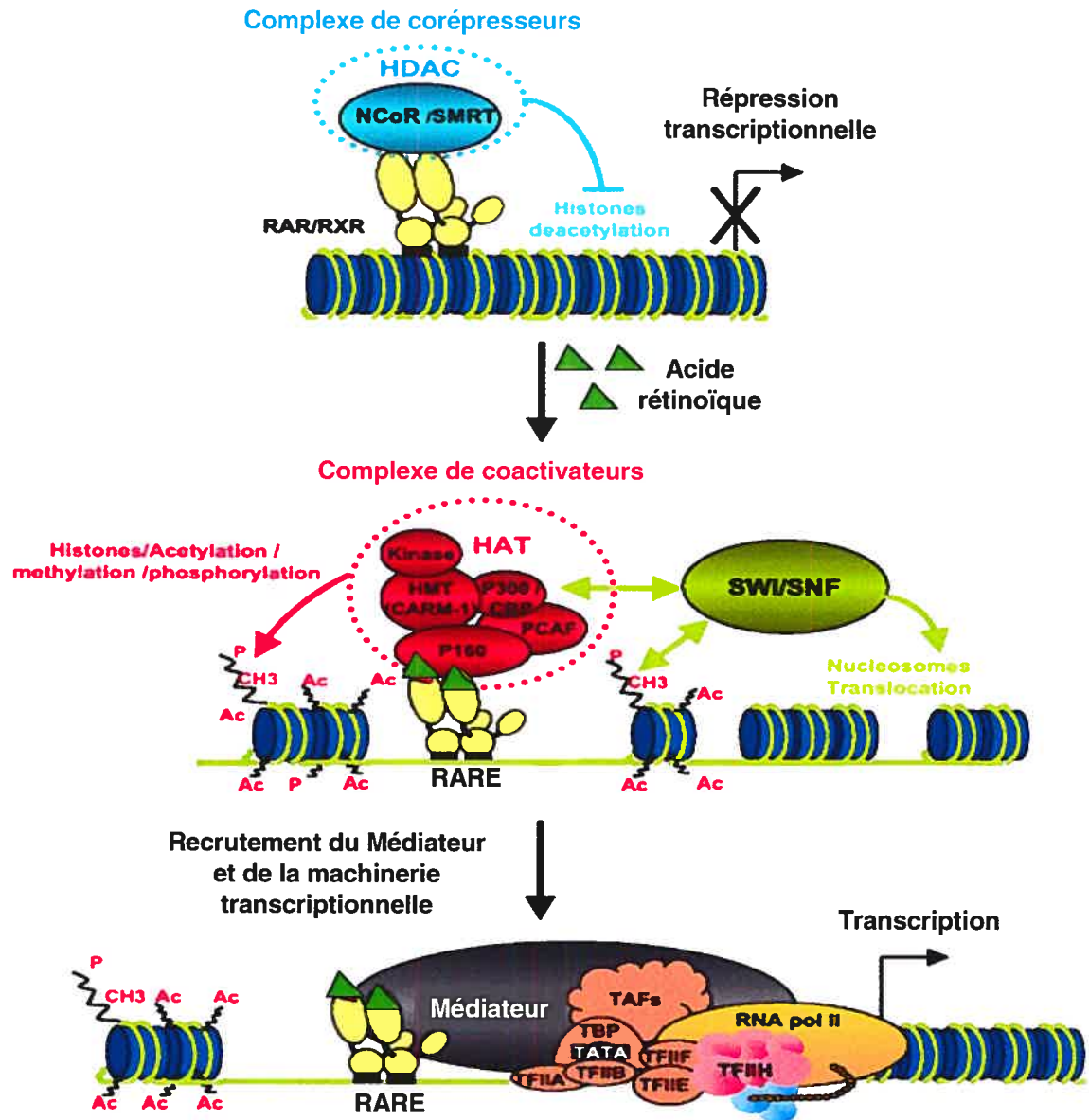


Figure 1-3. La régulation transcriptionnelle par les récepteurs à l'acide rétinoïque.

CARM, coactivateur arginine méthyltransférase; CBP, CREB-binding protein; HAT, histone acétyltransférase; HDAC, histone deacétyltransférase; HMT, histone méthyltransférase; NCoR, nuclear receptor corepressor; PCAF, p300/CBP-associated factor; RAR, récepteur à l'acide rétinoïque; RARE, rétinoic acid response element; RXR, récepteur X aux rétinoïdes; SMRT, silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor; SRC, steroid receptor-coactivator; TAF, transcription activating factor; TBP, TATA-binding protein; TF, transcription factor. Voir texte pour les détails. (Modifié de Bastien *et al.*, 2004)

thyroïdiens (TRs), ainsi que son homologue, SMRT (médiateur silencieux pour les récepteurs aux rétinoïdes et thyroïdiens) (Horlein *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995). La région D des récepteurs séparant le DBD et le LBD est essentielle à la répression et à l'interaction avec NcoR. Le LBD est également essentiel puisqu'il interagit directement avec les corépresseurs. L'ajout du ligand amène la dissociation des corépresseurs des récepteurs et le domaine AF-2 est essentiel pour ce phénomène (Munoz *et al.*, 1988; Damm *et al.*, 1989). En effet, les récepteurs nucléaires ne possédant pas ce domaine agissent comme répresseur transcriptionnel constitutif. Le mode de répression utilisé par NcoR et SMRT passe par le recrutement de déacétylases d'histones (HDAC) par les récepteurs à la région promotrice (Aranda *et al.*, 2001; Wei, 2003). Ces protéines sont retrouvées dans la cellule complexées avec plusieurs autres protéines, dont la protéine d'échaffaudage mSin3. Le complexe HDAC-mSin3 est abondant et stable et peut être recruté par les corépresseurs NCoR et SMRT, ce qui amène la déacétylation des histones par l'activité des HDAC. Ce phénomène a pour conséquence de rendre les histones plus basiques et ainsi augmenter leur degré de compaction avec l'ADN qui est acide. La machinerie transcriptionnelle ne peut donc pas avoir accès à l'ADN, ce qui mène à la répression.

En résumé, l'absence de ligand amène RXR : RAR à s'associer avec NCoR/SMRT qui recrute une HDAC associée à la protéine d'échaffaudage mSin3 ayant pour conséquence la répression transcriptionnelle.

### **1.2.5 L'activation de la transcription par les RARs**

La simple liaison du ligand au récepteur peut faire passer le récepteur d'un état répressif inactif à un état actif, par le relargage des corépresseurs et le recrutement des coactivateurs (Durand *et al.*, 1994). Plusieurs coactivateurs ont été identifiés jusqu'à ce jour. Certains coactivateurs (famille p160) sont nécessaires afin de recruter d'autres coactivateurs ayant une activité acétyltransférase (CBP/p300, P/CAF), méthyltransférase (CARM-1), de remodelage de la chromatine ATP-dépendante (SWI-SNF) ou d'association avec la machinerie transcriptionnelle (TRAP/DRIP), tous dans le but d'activer la transcription du gène cible (figure 1-3).

La famille de coactivateurs p160 comprend trois sous-familles, SRC-1, SRC-2 et SRC-3 (SRC : steroïd receptor coactivator). Ces coactivateurs ne semblent pas lier l'ADN malgré la présence du motif bHLH (hélice-boucle-hélice basique) dans leur

région N-terminale. Un domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires se retrouve dans la portion centrale de tous les coactivateurs p160 (Voegel *et al.*, 1998). Ce domaine contient trois boîtes NR de fonctions redondantes (Le Douarin *et al.*, 1996). Les boîtes NR sont de courtes séquences comprenant le motif LXXLL et qui sont essentiels pour l'interaction des coactivateurs avec le domaine AF-2 du récepteur. Lors de la liaison du ligand au LBD du récepteur, l'hélice H12 subit un changement conformationnel, formant une région chargée accommodant les coactivateurs p160. La séquence autour du motif LXXLL est requise pour la spécificité et agit en stabilisant l'interaction récepteur-coactivateur (McInerney *et al.*, 1998).

Même si SRC-1 et SRC-3 possèdent une faible activité acétyltransférase (HAT), le rôle principal des p160 est de servir de plate-forme moléculaire pour recruter d'autres coactivateurs ayant une forte activité HAT (Spencer *et al.*, 1997). Le recrutement de protéines HAT est essentiel, car elles permettent le transfert de groupement acétyl sur les histones, ce qui a pour effet de relâcher la chromatine et permettre la transcription du gène cible par la machinerie transcriptionnelle.

Il a été démontré que SRC-1 est capable d'interagir avec les protéines CBP (CREB binding protein) et p300. CBP a été originellement découvert par son interaction avec CREB en permettant son activation en réponse à l'AMPc, et p300 a été isolée via son interaction avec la protéine virale E1A (Eckner *et al.*, 1994; Kwok *et al.*, 1994). Ces deux protéines possèdent des propriétés communes et sont considérées comme des homologues fonctionnels. CBP/p300 peut interagir directement avec le LBD de plusieurs récepteurs nucléaires, mais son interaction se fait plutôt via les membres de la famille p160 (Edwards, 2000). Dans le cas des RARs, l'interaction de CBP avec SRC-1 semble être critique pour l'activation de la transcription (Kurokawa *et al.*, 1998). Cette interaction dépend de la liaison du ligand au récepteur et de la présence du domaine AF-2 (Chakravarti *et al.*, 1996; Kamei *et al.*, 1996). CBP/p300 semble être le principal coactivateur avec une activité HAT pour les RARs. En effet, sa nécessité a été démontrée par la microinjection d'anticorps anti-CBP qui empêche l'activation dépendante du ligand par les RARs et RXRs. De plus, les fibroblastes de souris p300<sup>-/-</sup> ne supportent plus la transcription via les RARs en présence d'AR (Yao *et al.*, 1998). Le rôle essentiel de CBP/p300 est en partie dû à sa structure comportant plusieurs domaines qui permettent le recrutement de différentes molécules-clés dans l'activation de la transcription. C'est pourquoi on lui donne souvent la caractéristique d'être un cointégrateur. On retrouve, en effet, un

bromodomaine, un domaine HAT, un domaine d'interaction avec SRC-1 ainsi qu'un domaine N-terminal d'interaction avec les récepteurs. CBP/p300 possède également une région composée de trois motifs en doigt de zinc, permettant l'interaction avec un autre coactivateur, P/CAF.

L'acétylase d'histones P/CAF (p300/CBP associated factor) est un coactivateur recruté par les RARs et dont la présence augmente la transcription dépendante des rétinoïdes (Blanco *et al.*, 1998). Contrairement à la famille p160 et à CBP/p300 dont le recrutement a lieu via l'AF-2, le DBD du récepteur est important dans la liaison de P/CAF. Effectivement, P/CAF ne possède pas de domaine LXXLL et ne peut, par conséquent, lier directement les domaines AF-2 des récepteurs nucléaires, mais P/CAF peut interagir directement avec le DBD du dimère RXR : RAR lié à l'AR (Blanco *et al.*, 1998). Ce dernier a été retrouvé parmi un complexe multiprotéique comprenant les TAFs (TATA-box binding proteins Associated Factors) et quelques membres TFIID. Le rôle de CBP/p300 et de P/CAF dans le complexe de coactivateurs p160 et comment ces protéines interagissent avec les récepteurs nucléaires n'est pas encore complètement compris (Blanco *et al.*, 1998; Korzus *et al.*, 1998).

Le coactivateur arginine méthyltransférase-1 (CARM-1) a été premièrement isolé dû à son interaction avec les coactivateurs p160 (Chen *et al.*, 1999a). En accord avec ces observations, d'autres études ont montré que CARM-1 augmente l'activité transcriptionnelle des RXR : RAR, mais seulement en présence d'un membre de la famille p160 (Koh *et al.*, 2001). Ces études renforcent le modèle selon lequel les coactivateurs p160, les HAT ainsi que les méthyltransférase d'histone fonctionnent ensemble afin de modifier les histones menant au remaniement de la chromatine.

Le complexe SW1/SNF, défini en premier chez la levure (Cote *et al.*, 1994), aurait un rôle particulier dans le remodelage de la chromatine. L'interaction de RXR : RAR avec la sous-unité catalytique Brg-1 a pour conséquence le déplacement des nucléosomes sur l'ADN. Son activité est dépendante de l'ATP et rend l'ADN plus accessible aux facteurs de transcription avec une activité HAT puis à la machinerie transcriptionnelle de base (Kwon *et al.*, 1994).

Le complexe TRAP/DRIP (thyroid receptor-associated protein/vitamin D interacting proteins) est recruté au récepteur nucléaire via l'AF-2 en réponse à la liaison du ligand, probablement sous la forme d'un complexe préformé (Rachez *et al.*, 2000). Toutefois, il a été démontré que TRAP220 interagit directement avec plusieurs autres récepteurs nucléaires ligandés, ce qui suggère que le complexe constitue un

coactivateur général (Yuan *et al.*, 1998). De plus, l'expression d'une forme tronquée de TRAP220 réprime l'activation des TR et VDR, tandis que la surexpression de la protéine active augmente sa fonction (Ito *et al.*, 2001). Contrairement aux coactivateurs p160 et CBP/p300, le complexe TRAP/DRIP ne semble pas agir au niveau de la chromatine et il est dépourvu d'activité HAT. Toutefois, plusieurs sous-unités du complexe TRAP/DRIP ressemblent aux protéines du Médiateur, concordant avec la possibilité qu'elles fonctionnent en reliant le complexe de co-activateur à la machinerie transcriptionnelle (Gu *et al.*, 1999). De plus, plusieurs protéines du Médiateur seraient associées avec l'ARN polymérase-II, appuyant la possibilité que le complexe TRAP/DRIP serait un composant de l'holoenzyme ARN polymérase-II.

En résumé, les coactivateurs agissent en tant qu'adapteurs entre les récepteurs nucléaires nouvellement liés au ligand et la machinerie transcriptionnelle. Des études sur les récepteurs aux estrogènes suggèrent que les coactivateurs comme p300, CBP et p/CAF seraient recrutés dans un ordre spécifique au promoteur (Shang *et al.*, 2000), ce qui amène le remodelage de la chromatine localement, suivi du recrutement de la machinerie transcriptionnelle. De façon intéressante, le complexe transcriptionnel lierait périodiquement le promoteur du gène cible, avec des cycles liés au promoteur et d'autres non. Ces cycles seraient dus en partie par la modification covalente des corégulateurs (Chen *et al.*, 1999b; Rowan *et al.*, 2000; Font *et al.*, 2000).

### **1.2.6 La rencontre avec d'autres voies de signalisation**

Les récepteurs nucléaires peuvent aussi médier l'expression génique indépendamment de la liaison aux éléments de réponse. En effet, ils peuvent influencer positivement ou négativement la transcription d'autres gènes (sans HRE) en interférant avec d'autres facteurs de transcription (Gottlicher *et al.*, 1998; Hecht *et al.*, 2000). Par exemple, certains récepteurs dont les RARs peuvent agir en tant que transrépresseur de l'activité du complexe AP-1, lorsqu'ils lient leur ligand et réciproquement, AP-1 peut inhiber la transactivation par les récepteurs nucléaires (Pfahl, 1993). L'effet anti-prolifératif attribué à certain ligand de récepteurs nucléaires pourrait être dû à leur activité anti-AP-1.

La phosphorylation des récepteurs nucléaires est un autre moyen de rencontre avec d'autres voies de signalisation. Certaines kinases comme les MAPKs, les

kinases dépendantes du cycle cellulaire (CDKs), la caséine kinase et la protéine kinase A, activées par un signal extra-cellulaire, peuvent se lier aux récepteurs nucléaires en surface et affecter leur activité (Shao *et al.*, 1999). L'effet de la phosphorylation sur l'activité des récepteurs peut être positif ou négatif dépendant du récepteur et des résidus impliqués.

### **1.3 Le rôle des rétinoïdes au cours du développement**

#### **1.3.1 L'insuffisance et l'excès d'acide rétinoïque**

Il y a bien longtemps que les biologistes étudient les différents effets de la carence ou de l'excès de vitamine A sur l'organisme. Le syndrome de déficience en vitamine A (VAD) a été rapporté dès 1925 (Wolbach *et al.*, 1925). Une carence en vitamine A chez les rongeurs amène une perte de poids, la stérilité, la cécité ainsi que des métaplasies squameuses avec ou sans kératinisation de plusieurs d'épithélium. On observe ces métaplasies dans les voies respiratoires, alimentaire, le système urogénital, les yeux ainsi que les glandes salivaires, les parotides, la prostate, les vésicules séminales, les glandes lacrymales et Harderiennes. Chez les femelles gestantes, la carence alimentaire en AR entraîne chez les embryons des défauts congénitaux qui affectent le cœur et les dérivés des arches aortiques, le système respiratoire, urogénitale ainsi que les yeux. L'administration orale d'AR peut corriger ces défauts, à l'exception de ceux associés à la vision (Wilson J.G. *et al.*, 1949; Wilson J.G. *et al.*, 1953; Thompson J.N. *et al.*, 1964).

#### **1.3.2 L'invalidation génique des RARs chez la souris**

Afin de mieux comprendre le rôle de chacun des gènes *RARs* et de déterminer s'il y a une redondance fonctionnelle entre eux, il était nécessaire de bloquer leur signalisation. Des expériences d'invalidation génique pour chacun des *RARs* et leur isoformes ont été faites et les différents mutants ont été caractérisés.

D'abord, les transcrits du gène *RAR $\alpha$*  sont retrouvés un peu partout chez l'embryon et l'adulte. Les mutants *RAR $\alpha$ 1* semblent normaux et en santé, ce qui suggère une homologie fonctionnelle complète entre les isoformes  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 (Lufkin *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993). Par contre, la délétion des deux isoformes du gène *RAR $\alpha$*

entraîne un retard de croissance et un taux de mortalité élevé après la naissance, ressemblant à ce que l'on observe lors d'une déficience en vitamine A (Lufkin *et al.*, 1993). De plus, les mâles sont stériles. Certaines malformations congénitales qui n'ont pas été observées lors du VAD sont retrouvés à faible fréquence chez les mutants *RAR $\alpha$* , comme des pattes palmées.

La distribution des transcrits du gène *RAR $\beta$*  dans l'embryon et chez l'adulte est plus restreinte et elle est associée à un rôle des différents isoformes dans la différenciation de certains épithélium et dans l'ontogenèse du système nerveux central (Dollé *et al.*, 1990; Ruberte *et al.*, 1991). Les mutants *RAR $\beta$*  ne démontrent pas d'anomalies sévères, à l'exception d'une fusion entre le neuvième et dixième nerfs craniaux qui a été observé chez un embryon sur onze analysés (Luo *et al.*, 1995). Le récepteur *RAR $\beta$*  ne semble donc pas être essentiel dans le développement des mammifères.

Les transcrits du gène *RAR $\gamma$*  ont été retrouvés dans la région présomitique au stade embryonnaire 8.0 (E8.0) où le jour zéro correspond au jour du coït, et ensuite dans le mésenchyme fronto-nasal, les arches pharyngiens, le sclérotome et le mésenchyme des bourgeons des membres du stade E8.5 au stade E11.5. Au stade E12.5, les transcrits *RAR $\gamma$*  ont été trouvés dans les condensations précartilagineuses et ensuite, ils sont restreints au cartilage et aux épithélium squameux en différenciation (E13.5) (Dollé *et al.*, 1989; Dollé *et al.*, 1990; Ruberte *et al.*, 1990). Ces observations suggèrent un rôle de *RAR $\gamma$*  dans la morphogenèse, la chondrogenèse et la différenciation des épithéliums squameux. D'abord, l'inactivation du gène *RAR $\gamma$ 2* n'a pas de conséquences évidentes sur le phénotype des souris. Elles sont fertiles et semblent normales, contrairement aux souris mutantes pour tous les isoformes (Lohnes *et al.*, 1993). En plus d'un retard de croissance, les souris *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>* présentent un taux de mortalité plus élevé que les souris *RAR $\gamma$*  hétérozygotes et de type sauvage et moins de 40% survivent passé l'âge de trois mois. Par contre, les fœtus semblent normaux et l'équipe n'a noté aucune mort *in utero*. Une analyse plus approfondie des squelettes des mutants a montré différentes malformations, dont une au niveau du cartilage trachéal présente chez tous les mutants analysés. De plus, les souris *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>* présentent un retard de croissance très tôt après la naissance ainsi qu'un problème au niveau des yeux. L'analyse du tractus uro-génital a révélé quelques anomalies seulement chez les mâles. D'abord, les mutants survivent au-delà de la maturité



sexuelle et les mâles sont stériles. Une analyse plus profonde du tractus a permis de constater que la prostate ainsi que les vésicules séminales des mutants adultes présentaient une métaplasie squameuse avec ou sans kératinisation de l'épithélium glandulaire (Lohnes *et al.*, 1993) semblable à celui observé lors du VAD (Wolbach *et al.*, 1925). C'est ce qui peut expliquer la stérilité des mâles. En effet, la prostate et les vésicules séminales sont responsables de la synthèse de liquides nourriciers, essentiels pour la viabilité des spermatozoïdes (voir section suivante). Par contre, aucun autre tissu n'est atteint, contrairement aux souris VAD dont plusieurs épithéliums montrent une métaplasie (Wolbach *et al.*, 1925).

Ces études démontrent qu'au moins un isoforme RAR $\gamma$  est essentiel pour le développement et le fonctionnement normal de la souris. De plus, la métaplasie squameuse avec ou sans kératinisation des épithéliums est retrouvée chez les animaux privés de vitamine A (syndrome VAD) (Wolbach *et al.*, 1925), ce qui suggère que RAR $\gamma$  est directement impliqué dans la transduction du signal par l'AR (Lohnes *et al.*, 1993).

## 1.4 La prostate

### 1.4.1 L'anatomie, l'histologie et la physiologie de la prostate

Les glandes accessoires du tractus génital masculin (TGM) comprennent la prostate, les vésicules séminales et les glandes bulbo-urétales. Parmi celles-ci, la prostate est l'une des plus étudiée (Janulis *et al.*, 1999). Cette glande exocrine est retrouvée exclusivement chez les mammifères. Elle est située à la base de la vessie et entoure l'urètre. Chez l'humain, la prostate est présente en un seul lobe qui est délimité en deux sections par l'urètre, la section ventrale et dorsale. Cette dernière est séparée à son tour en quatre parties : la zone périphérique, centrale et transitionnelle et la glande périurétrale. Contrairement à l'humain, la prostate de rongeurs (rat et souris) ne possède que quatre lobes distincts, nommés selon leur localisation : le lobe ventral, dorsal, latéral et antérieur. Ils sont moins développés chez la souris comparativement au rat. Chaque lobe possède une structure unique et une synthèse protéique spécifique (McNeal, 1988).

La prostate est composée de différents types cellulaires, dont les cellules stromales et épithéliales (McNeal, 1988). Le stroma comprend entre autres des

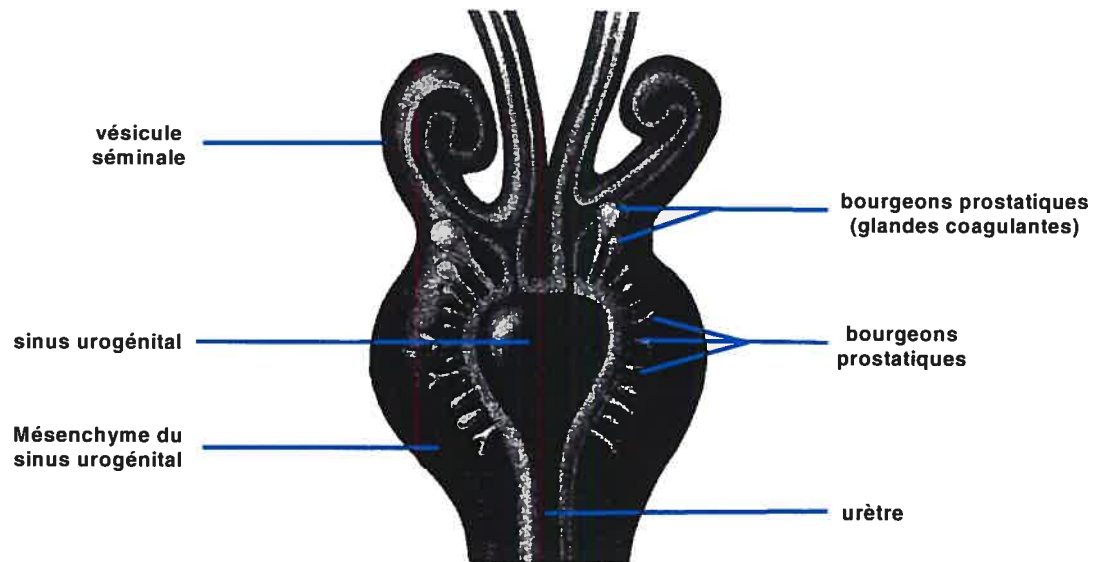
cellules musculaires lisses et des fibroblastes. Le stroma joue un rôle primordial dans la morphogenèse de la prostate en médiant l'effet des androgènes sur l'épithélium (Cunha *et al.*, 1979; Cunha *et al.*, 1983). L'épithélium quant à lui, consistent en deux principaux types cellulaires, les cellules basales et les cellules luminales. L'épithélium contient également des cellules neuroendocriniennes, dont le rôle pourrait être relié au cancer de la prostate (Abrahamsson, 1996). Les cellules basales qui longent la membrane basale sont cubiques, non-sécrétoires et semblent être les cellules souches de cet organe. Les cellules luminales sont dominantes et plutôt cylindriques. Ces cellules sont sécrétoires et dépendantes des androgènes puisque ces cellules disparaissent suite à la castration.

La prostate est une glande exocrine dont les sécrétions sont transportées par l'urètre et sont déposées dans le fluide séminal afin d'aider le transport du sperme et réguler la fertilité. La prostate est responsable de la sécrétion de plusieurs protéines dont la PSA et l'acide phosphatase (Lee *et al.*, 1986) et l'analyse de la présence de la PSA dans le sang est utilisée pour la détection d'un cancer de la prostate. Les protéines synthétisées et sécrétées par les cellules luminales sont sous le contrôle du système endocrinien. La prostate est aussi un organe très riche en zinc et en sélénium (Bedwal *et al.*, 1994). Le zinc semble être responsable entre autres de l'activité prolongée du sperme.

#### **1.4.2 La croissance et la différenciation de la prostate**

La prostate est constituée d'un réseau élaboré de canaux tapissés de cellules sécrétrices. Le réseau de canaux de la prostate est dérivé d'excroissances épithéliales ou bourgeons prostatiques, émergeant du sinus urogénital (UGS). Les bourgeons prostatiques se développent dans le mésenchyme du UGS. Chez l'humain, les premiers bourgeons apparaissent vers la dixième semaine de gestation; chez la souris, ils apparaissent vers le 17<sup>e</sup> jour de gestation (Johnson F.P., 1920; Cunha *et al.*, 1987). Chez la souris, un à trois canaux principaux de chaque côté émergent du côté ventral du UGS contrairement à une vingtaine du côté dorsolatéral (figure 1-4). Ces deux groupes sont à l'origine des lobes ventral et dorsal respectivement. Les glandes coagulantes (prostate antérieure) quant à elles, origines de deux gros bourgeons de chaque côté qui vont croître dans le mésenchyme des vésicules séminales (Lung *et*

*al.*, 1981; Sugimura *et al.*, 1986). La morphogenèse des bourgeons se poursuit après la naissance et est presque complète chez les souris âgées de deux semaines.



**Figure 1-4. Schéma du tractus urogénital mâle de la souris naissante.**

Voir texte pour les détails. (Modifié de Cunha *et al.*, 1987).

#### 1.4.2.1 Le rôle des androgènes

Les androgènes provenant des testicules sont les principaux régulateurs de la croissance de la prostate, de la différenciation et de la maintenance de cette glande. En effet, la croissance de la prostate dépend de la présence des testicules, car leur ablation avant la différenciation sexuelle prévient le développement de la prostate (Jost A., 1953). Tôt dans le développement, les androgènes agissent via les récepteurs aux androgènes retrouvés sur les cellules du mésoenchyme et agissent sur les cellules épithéliales afin de stimuler leur prolifération, la formation des bourgeons, l'élongation des canaux et la morphogenèse (Cooke *et al.*, 1991). Une fois la taille maximale atteinte, le traitement aux androgènes n'induit plus la synthèse d'ADN (Berry *et al.*, 1984), ce qui suggère l'existence d'un mécanisme d'homéostasie contrôlant le nombre de cellules prostatiques.

Les androgènes sont produits par les testicules sous le contrôle de l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) qui sont synthétisées et sécrétées par l'hypophyse antérieure sous le contrôle d'une hormone de l'hypothalamus, l'hormone de relâchement des gonadotropines par l'hypothalamus (GNRH). Les gonadotropines sont relâchées par l'hypophyse antérieure en réponse à plusieurs stimuli et passent dans la circulation sanguine pour agir sur les récepteurs LH et FSH des cellules de Leydig et des cellules de Sertoli respectivement, retrouvées dans les testicules (De Kretser *et al.*, 1971; Orth *et al.*, 1977). La LH est responsable de la production de la testostérone par les cellules de Leydig et la FSH est importante dans la synthèse des spermatozoïdes et dans la production de la protéine liant les androgènes (ABP) dans le sérum. L'ABP permettrait l'accumulation des androgènes dans les cellules et les tissus. Malgré le fait que la testostérone soit le premier androgène produit par les testicules, il semble que c'est la 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone (DHT) qui possède l'activité biologique. La DHT est produit dans le UGS par la réduction enzymatique de la testostérone par la 5 $\alpha$ -réductase, retrouvée dans les cellules stromales (Ekman, 1995). L'inhibition de cette enzyme féminise le tractus génital et inhibe partiellement la morphogenèse de la prostate chez le rat (Imperato-McGinley *et al.*, 1985).

L'action des androgènes se fait par la liaison de la DHT aux récepteurs aux androgènes. En fait, la testostérone peut également lier les récepteurs aux androgènes, mais avec moins d'affinité que la DHT (Petrov, 1990). Suite à la liaison de la DHT à ces récepteurs, le complexe activé transfère au noyau pour aller lier les éléments de réponse aux androgènes localisés dans la région promotrice des gènes cibles, ce qui va amener le recrutement de coactivateurs d'une façon très semblable aux RARs (voir ci-dessus).

#### *1.4.2.2 Les interactions mésenchyme-épithélium dans le développement de la prostate*

Les interactions entre le mésenchyme et l'épithélium sont essentielles dans le développement des glandes et les organes. Ce qui distingue la prostate des autres organes, c'est qu'elle a en plus besoin des androgènes pour son développement. Lorsque l'épithélium urogénital et son mésenchyme sont séparés et greffés sur un rein, il y a une faible différenciation de chacun. Quand les deux composants sont associés de nouveau et greffés au même site, la morphogenèse de la prostate débute

seulement en présence des androgènes (Cunha *et al.*, 1987). Plusieurs expériences de recombinaison impliquant l'épithélium et le mésenchyme urogénital ont permis d'établir que les récepteurs aux androgènes du mésenchyme sont nécessaires pour la morphogenèse. Par contre, les récepteurs aux androgènes de l'épithélium ne sont pas requis pour ce processus. Toutefois, en leur absence, les protéines sécrétoires de la prostate ne sont pas exprimées (Donjacour *et al.*, 1990). Ces expériences ont permis de définir d'importants principes au niveau de la biologie de la prostate. Le contrôle androgénique de la prolifération de l'épithélium de la prostate est médié par les récepteurs aux androgènes retrouvés dans le mésenchyme pendant que l'activité sécrétoire de l'épithélium requiert les récepteurs aux androgènes épithéliaux.

La prostate des rongeurs est composée de lobes bien définis qui possèdent un patron unique d'embranchements et de protéines sécrétoires. Cette morphologie spécifique à chaque lobe semble être induite par différentes sous-populations de mésenchymes dans le UGS. Par exemple, seulement le mésenchyme urogénital ventral est un inducteur de la différenciation de la prostate ventrale (Timms *et al.*, 1995).

Les interactions mésenchyme-épithélium sont réciproques, c'est-à-dire que le mésenchyme induit la différenciation de l'épithélium et ensuite, l'épithélium induit à son tour le mésenchyme à se différencier en muscle lisse. La différenciation en muscle lisse dans le TGM est régulée via des interactions cellule-cellule (Cunha *et al.*, 1992). Les facteurs de croissance semblent être les médiateurs de ces interactions mésenchyme-épithélium.

#### *1.4.2.3 Le rôle des facteurs de croissance dans les interactions mésenchyme-épithélium*

Plusieurs facteurs de croissance produits par les cellules de l'épithélium et/ou du mésenchyme agissent de façon réciproque afin de coordonner la croissance et la fonction de la prostate. Les facteurs de croissance retrouvés dans la prostate sont impliqués dans la réponse de prolifération et de différenciation résultant de l'effet des androgènes sur le mésenchyme urogénital pendant le développement, mais également dans la maintenance de la prostate adulte en arrêt de croissance, ce qui dépend également des androgènes. Je traiterai brièvement des principaux facteurs ayant une influence importante sur la croissance de la prostate.

Un membre de la famille des facteurs de croissance fibroblastique (FGF), FGF-7, est produit par le stroma de la prostate (Sugimura *et al.*, 1996). Son récepteur FGF2-iiiib est retrouvé exclusivement dans l'épithélium (Leung *et al.*, 1997; Matsubara *et al.*, 1998). Par des études chez de jeunes rats, il a été démontré que FGF-7 est impliqué dans la croissance androgènes-dépendante et le développement de la prostate (Sugimura *et al.*, 1996). De plus, FGF-7 exogène est capable d'induire la morphogenèse des embranchements d'explants de prostate privés de testostérone ainsi que leur croissance de façon comparable à celle induite par la testostérone. Il est donc possible que la testostérone dans la circulation sanguine agisse via les récepteurs aux androgènes du mésenchyme pour stimuler la sécrétion de FGF-7, qui, à son tour, stimule la morphogenèse des canaux de la prostate.

Le facteur de croissance relié à l'insuline-I (IGF-I) est un polypeptide dont la séquence des acides aminés et la fonction sont semblables à celles de l'insuline. Les IGFs sont d'importants facteurs mitogéniques de la prostate et sont essentiels pour son développement et sa croissance. Les mutants *IGF-I<sup>-/-</sup>* ont une prostate plus petite comparativement au WT (Ruan *et al.*, 1999). L'administration de IGF-I restore partiellement le phénotype en augmentant le nombre d'embranchements et donc, la taille de la prostate. IGF-I est produit par les cellules du mésenchyme et les cellules de l'épithélium expriment le récepteur correspondant, IGF-IR et les protéines de liaison aux IGFs (IGFBP-2, -3, -4 et -6) (Lopaczynski *et al.*, 2001). IGF-I est aussi impliqué dans le cancer de la prostate (Wang *et al.*, 1998b).

Le facteur de croissance hépatocytaire (HGF) est une glycoprotéine sécrétée principalement par les cellules du mésenchyme et son récepteur c-Met est retrouvé chez les cellules épithéliales. Des études ont montré que HGF interagirait avec le mésenchyme des vaisseaux sanguins pour promouvoir l'angiogenèse en plus d'agir sur les cellules de l'épithélium. HGF aurait également un rôle dans le cancer de la prostate.

Le facteur de croissance transformant bêta-1 (TGF- $\beta$ 1), un régulateur de la croissance cellulaire, est produit par les cellules du mésenchyme afin d'inhiber la croissance cellulaire épithéliale et de réguler la différenciation et la migration cellulaire (Massague, 1990). Une accumulation de ce facteur de croissance est observée dans différents stades du cancer de la prostate (Timme *et al.*, 1996).

## 1.5 Le cancer de la prostate

### 1.5.1 Épidémiologie

Le cancer de la prostate est la deuxième cause de mortalité due à un cancer aux États-Unis, après le cancer du poumon. Dans les pays développés, un homme sur neuf âgés de plus de 65 ans développera un cancer de la prostate. En 2005, il est estimé que 232 090 nouveaux cas de cancer de la prostate seront diagnostiqués et que 30 350 hommes en décéderont aux États-Unis seulement (Jemal *et al.*, 2005). La mesure du taux de PSA sérique ainsi que l'examen rectal digital pour la détection du cancer de la prostate a permis d'établir un diagnostic plus tôt dans la dernière décennie. Malgré tous les efforts investis dans la détection et les traitements précoces, le cancer de la prostate reste un fléau dans la société occidentale. De récentes découvertes ont mené à une meilleure compréhension des événements moléculaires et génétiques associés à ce cancer.

### 1.5.2 Initiation et développement

Il existe deux principaux types de maladie associée à la prostate, soient l'hyperplasie bénigne de la prostate (BHP) et le cancer de la prostate. L'incidence de ces deux maladies augmente avec l'âge et les deux ont besoin des androgènes pour proliférer. Par contre, la BHP n'est pas une lésion précurseur du cancer de la prostate. Le cancer de la prostate débute par un stade précoce dépendant des androgènes qui est confiné à la prostate seulement vers un stade avancé indépendant des androgènes et métastatique. La capacité des cellules tumorales à migrer vers des organes distants est la principale cause de décès relié aux cancers. Les principaux sites de migration des cellules cancéreuses de la prostate sont les nœuds lymphatiques ainsi que les os. Plus de 70% des hommes décédés du cancer de la prostate possédaient des métastases dans le système osseux. Le développement du cancer de la prostate est un phénomène qui dépend d'une multitude de facteurs comme l'âge, la race, l'alimentation, l'environnement, les antécédents familiaux, etc. Différents événements génétiques et moléculaires peuvent également mener au développement du cancer de la prostate.

### 1.5.3 Facteurs génétiques et moléculaires

Comme d'autres tumeurs, le cancer de la prostate est le résultat de l'accumulation de mutations et d'événements génétiques qui confèrent un phénotype malin aux cellules normales. La dérégulation d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur peuvent mener au développement d'un cancer de la prostate.

Le proto-oncogène *c-myc* code pour un facteur de transcription. Une mutation gain de fonction dans ce gène est observée dans 89% des cas de récurrence après une thérapie hormonale. *c-myc* est un gène exprimé très tôt suite à une stimulation par les androgènes (Emmert-Buck *et al.*, 1995). Une surexpression de la protéine *c-myc* dans des souris transgéniques amène le développement de néoplasies dans la prostate (Zhang *et al.*, 2000).

Le gène *p53* est le gène le plus muté retrouvé dans les différents cas de cancers. Une mutation dans le gène tumeur-suppresseur *p53* est retrouvée dans les cancers de la prostate à une fréquence variant de 3% à 79% (Hall *et al.*, 1995). *p53* possède différentes fonctions comme l'induction de l'arrêt de croissance, de la réparation de l'ADN et de l'apoptose en réponse à des dommages à l'ADN.

Le gène *PTEN* est un suppresseur de tumeur codant pour une lipide phosphatase qui régule négativement la voie du phosphatidyl-inositol-3 kinase (PI3K) menant à l'inactivation de la protéine kinase B (AKT). *PTEN* possède un rôle dans l'apoptose, dans le contrôle du cycle cellulaire et dans l'angiogenèse. La perte de l'hétérozygotie est détectée dans 15-49% des cas de cancer de la prostate et est associée à des cancers avancés (Wang *et al.*, 1998a).

IGF-I est un stimulateur de la croissance des cellules normales et néoplasiques et possède une activité anti-apoptotique sur les cellules épithéliales de la prostate en activant les voies des MAPK et PI3K (Rajah *et al.*, 1997). En 1998, une corrélation a été faite entre un taux élevé de IGF-I dans le sang chez les hommes de plus de 40 ans et le risque de développer un cancer de la prostate (Chan *et al.*, 1998).

La  $\beta$ -caténine est une composante centrale de la voie de signalisation des Wnt et est associée à des processus développementaux comme la spécification cellulaire, la polarité et la migration. La  $\beta$ -caténine a été retrouvée mutée dans environ 5% des cas de cancer de la prostate (Voeller *et al.*, 1998), menant à une  $\beta$ -caténine constitutivement active. Je m'intéresse particulièrement à cette molécule dans le cadre de ce mémoire, je traiterai donc d'une voie majeure impliquant la  $\beta$ -caténine dans la section suivante.



#### 1.5.4 La $\beta$ -caténine dans la voie canonique des Wnt

Les Wnt sont au cœur de plusieurs voies de signalisation impliquées dans le développement embryonnaire et dans l'homéostasie chez l'adulte. La voie canonique est la première voie découverte et la mieux caractérisée (Logan *et al.*, 2004). Le joueur central de cette voie est la  $\beta$ -caténine. La voie non-canonique n'implique pas la  $\beta$ -caténine, mais partage certaines composantes de la voie canonique. La voie non-canonique est impliquée dans la polarité planaire et dans la voie du calcium. Cependant, cette dernière reste mal connue et n'est pas pertinente dans le rôle de la voie des Wnt dans la prostate. Je m'en tiendrai donc à la description de la voie canonique seulement dans les sections suivantes.

##### 1.5.4.1 La signalisation extracellulaire

Les Wnt sont de puissants régulateurs de la prolifération cellulaire et de la différenciation. Ce sont des protéines sécrétoires encodés par 19 gènes différents chez les mammifères (Wodarz *et al.*, 1998). Il existe également plusieurs récepteurs *frizzled* (Fz) aux Wnt. Au moins 11 gènes *frizzleds* ont été identifiés chez les vertébrés, mais la différence dans leur fonction et la spécificité envers leur ligand sont peu connus. Pour l'activation de la voie canonique des Wnt, ces derniers doivent lier le récepteur Fz ainsi que son co-récepteur LRP (LDL receptor related protein) (Tamai *et al.*, 2000; Wehrli *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 2001). La découverte de protéines liant LRP, comme Dickkopf et son récepteur Kremen, a permis d'identifier un nouveau mécanisme de régulation de la voie des Wnt (Mao *et al.*, 2002). LRP serait internalisé après la liaison de Dickkopf-Kremen, ce qui empêcherait Wnt de transmettre son signal à la voie canonique.

Une autre famille de protéines est capable de lier les Wnt, ce sont les protéines FRPs (*frizzled-related proteins*). Comme leur nom l'indique, les FRPs possèdent une homologie avec les protéines Fz au niveau du domaine extracellulaire riche en cystéine. En liant les Wnt, les FRP exercent un effet antagoniste sur leur signalisation (Leyns *et al.*, 1997). Par contre, ce n'est pas toutes les FRPs qui inhibent les Wnt. Par exemple, sFRP-3 lie wnt-5a mais n'est pas capable d'inhiber son activité (Lin *et al.*, 1997). L'effet des FRPs semblerait même dépendre de la quantité (Uren *et al.*, 2000). Les plus connus sont Frizbee, WIF et Cerberus qui antagonisent la voie des Wnt (Wang *et al.*, 1997; Hsieh *et al.*, 1999; Piccolo *et al.*, 1999).

#### 1.5.4.2 La signalisation intracellulaire

En absence de Wnt, la  $\beta$ -caténine cytoplasmique est phosphorylée par des sérine/thréonine kinase nommées caséine kinase  $1\alpha$  (CKI $\alpha$ ) et GSK3 $\beta$  (Yost *et al.*, 1996; Amit *et al.*, 2002). L'interaction entre la  $\beta$ -caténine et ces kinases est favorisée par des protéines d'échaffaudage, comme l'axin et APC (Hart *et al.*, 1998). Ensemble, ces protéines forment un complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine qui permet la reconnaissance de la  $\beta$ -caténine phosphorylée par  $\beta$ -TrCP (composante de l'ubiquitine ligase E3), l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome (Aberle *et al.*, 1997), ce qui empêche l'activation des gènes cibles (figure 1-5A).

L'activation de la voie des Wnt empêche la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine et donc sa dégradation (figure 1-5B). Une fois Wnt lié à son récepteur Fz, il y aurait phosphorylation de la protéine Dvl (Chen *et al.*, 2003). Cette phosphorylation se ferait grâce à une protéine G. En effet, la mutation de G- $\alpha$ 47A chez la drosophile imite l'effet de la perte du signal de transduction des Wnt et la surexpression de G $\alpha$  ressemble à un gain de fonction dans l'établissement des patrons embryonnaires (Katanaev *et al.*, 2005). Ces résultats proposent donc que le récepteur Fz agisse comme facteur d'échange du GTP pour activer G $\alpha$  et permettre les événements en aval. Dsv aurait une fonction double puisqu'il peut activer la voie canonique et non-canonique. En effet, Dvl peut relayer le signal des Wnt en stabilisant la  $\beta$ -caténine (voie canonique) ou amener l'activation des Jun kinases (voie non-canonique) (Li *et al.*, 1999).

Comme Fz, LRP peut interagir avec les composants intracellulaires de la voie des Wnt. Puisque LRP peut établir un lien avec la protéine axin, il est pensé que les Wnt induiraient la phosphorylation de LRP (Mao *et al.*, 2001). Il est connu que Dsv et l'axin possèdent un domaine DIX qui peut s'homodimériser. Il est donc possible que la liaison de Wnt au récepteur Fz induise l'interaction entre l'axin et Dsv via leur domaine DIX (Hedgepeth *et al.*, 1999; Itoh *et al.*, 2000). Cette interaction préviendrait la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine par une réorganisation du complexe de dégradation amenant son inactivation.

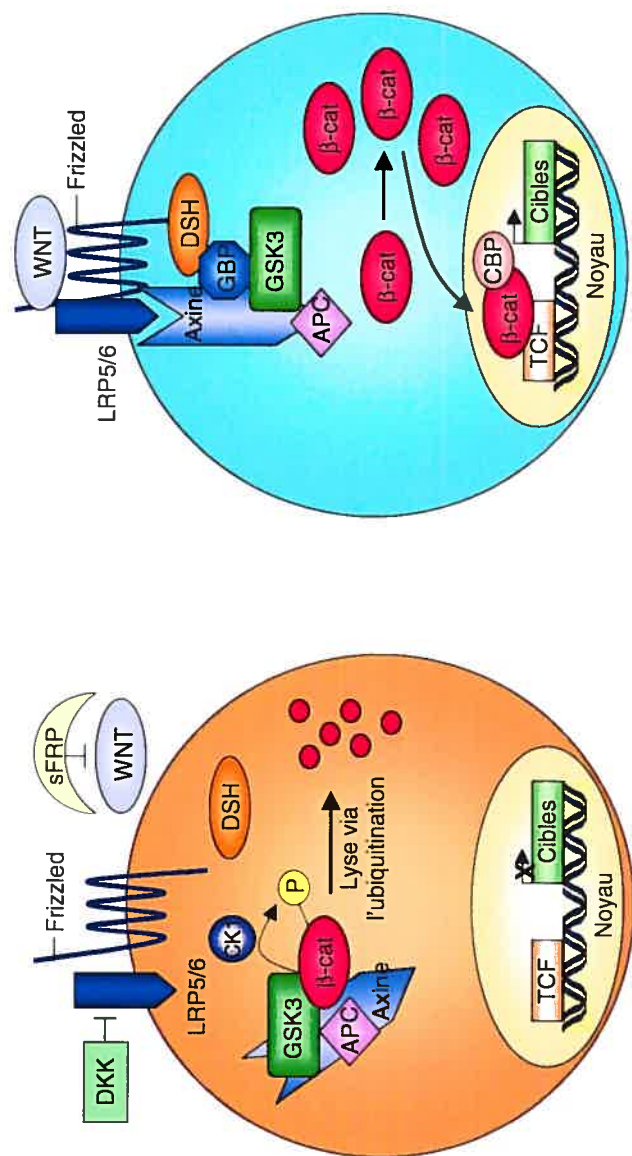
La  $\beta$ -caténine stabilisée peut ensuite entrer dans le noyau où elle interagit avec les facteurs de transcription LEF/TCFs qui lie l'ADN via leur domaine HMG (van de Wetering *et al.*, 1997). On retrouve quatre membres chez les mammifères, soient TCF-1, LEF, TCF-3 et TCF-4. En absence de Wnt, TCF agit comme répresseur

transcriptionnel en formant un complexe avec TLE/Groucho (Brannon *et al.*, 1997; Cavallo *et al.*, 1998). La  $\beta$ -caténine, une fois au noyau, convertirait le complexe répresseur en complexe activant la transcription. Le déplacement de Groucho par la  $\beta$ -caténine et le recrutement de l'acétylase d'histones CBP/p300 et SWI/SNF semblent être à l'origine de l'activation de la transcription (Hecht *et al.*, 2000; Barker *et al.*, 2001).

La signalisation par les Wnt peut être contrôlée dans le noyau par différentes protéines. Par exemple, Chibby est un antagoniste qui lie le domaine C-terminal de la  $\beta$ -caténine (Takemaru *et al.*, 2003). ICAT interagit également avec la  $\beta$ -caténine en bloquant la liaison de la  $\beta$ -caténine à TCF et provoquerait la dissociation des complexes entre la  $\beta$ -caténine, LEF et CBP/p300 (Tago *et al.*, 2000).

Une mutation au niveau de l'exon 3 de la  $\beta$ -caténine est retrouvée dans différents cancers, comme le cancer du colon (Morin *et al.*, 1997), de la peau (Rubinfeld *et al.*, 1997), du foie (Miyoshi *et al.*, 1998), des glandes mammaires (Michaelson *et al.*, 2001) et celui de la prostate (Voeller *et al.*, 1998), entraînant une  $\beta$ -caténine constitutivement active. En effet, l'exon 3 de la  $\beta$ -caténine contient les résidus sérine qui sont phosphorylés par le complexe de dégradation. Une mutation au niveau de ces résidus empêchant cette phosphorylation entraîne une  $\beta$ -caténine toujours active.

En plus de causer différents cancers, une stabilisation de la  $\beta$ -caténine peut entraîner une métaplasie. La métaplasie d'un tissu est la transformation de celui-ci en un autre tissu, doué de propriétés physiques ou chimiques différentes. Ce nouveau tissu est qualitativement normal, mais anormal par sa localisation. Le phénomène de métaplasie est normal au cours du développement embryonnaire (tissu conjonctif qui se transforme en tissus cartilagineux, osseux et médullaires), mais il est pathologique lorsqu'il se produit chez un organisme déjà constitué. Ce phénomène est observé au niveau des tissus épithéliaux entres autres, comme la prostate (Gounari *et al.*, 2002), où le tissu glandulaire prostatique devient stratifié (avec ou sans kératinisation) comme de la peau.



**Figure 1-5. Schéma de la voie canonique des Wnt.**

(A) En absence de Wnt. (B) En présence de Wnt. APC, adénomatous polyposis coli; β-cat, β-caténine; CBP, CREB-binding protein; CK, casein kinase; DKK, Dickkopf; DSH, Dishevelled; GBP, GSK3-binding protein; GSK, glycogen synthase kinase; LRP, LDL-receptor-related protein; P, phosphorylation; sFRP, secreted Frizzled-related protein; TCF, T-cell factor. Voir texte pour les détails.

## 1.6 L'acide rétinoïque et la prostate

### 1.6.1 L'acide rétinoïque dans le développement et le cancer de la prostate

Dès les premières études sur les effets de l'AR sur le développement, un changement au niveau de la structure tissulaire de la prostate (métaplasie) a été remarqué en absence de vitamine A (Wolbach et al., 1925) et que ce changement peut être renversé par l'administration d'AR ou de rétinol (Thompson J.N. et al., 1964). Plus récemment, l'équipe du Dr Stamey a montré que la vitamine A est un régulateur de la croissance et de la différenciation des cellules prostatiques. Il a été observé que l'AR stimule la croissance de cellules de prostate normale, BPH et cancéreuses à de faible concentration et possède un effet plutôt inhibiteur à de fortes concentrations (Peehl et al., 1993). Cet effet biphasique a également été observé avec d'autres types cellulaires ainsi qu'avec des hormones stéroïdiennes (Butler et al., 1992; Miller et al., 1992). De plus, l'AR semble altérer la morphologie, la communication intercellulaire et l'expression de la kératine, en plus d'altérer la prolifération de façon dépendante de la concentration (Peehl et al., 1993).

La vitamine A et ses analogues synthétiques, les rétinoïdes, sont parmi les molécules les plus étudiées pour leur rôle dans la prévention du cancer de la prostate. Des expériences sur des explants de prostate en culture ont montré que l'AR *tout-trans* peut inhiber et renverser l'effet prolifératif de carcinogènes sur l'épithélium de la prostate (Lasnitzki et al., 1974; Chopra et al., 1976). Des études plus récentes ont également montré un effet inhibiteur des rétinoïdes sur des cellules de prostate cancéreuses *in vitro* et sur le développement du cancer de la prostate (Blutt et al., 1997; McCormick et al., 1999). Par contre, cet effet semble être limité aux cellules dépendantes des androgènes (Campbell et al., 1998). Des évidences au niveau de la croissance indiquent que l'effet inhibiteur des rétinoïdes sur les cellules prostatiques cancéreuses, entres autres, serait dû à leur effet apoptotique (Nagy et al., 1998; Bruckheimer et al., 2000). L'effet apoptotique des rétinoïdes a aussi été observé dans le développement. Les malformations des membres induites par les rétinoïdes sont associées à un niveau trop élevé d'apoptose dans la région de l'ectoderme apical (Sulik et al., 1988), tandis que les rétinoïdes régulent le développement du système nerveux central par leur effet apoptotique, entres autres (Alles et al., 1992). Par contre, le mécanisme par lequel les rétinoïdes induisent l'apoptose n'est pas encore bien caractérisé, mais l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses de la

prostate semble être associée à une diminution de l'expression de Bcl-2 (DiPaola *et al.*, 1999) et à l'induction d'une protéine de liaison à l'IGF, IGFBP-3 (Goossens *et al.*, 1999).

### **1.6.2 L'acide rétinoïque et les androgènes**

Les androgènes et la vitamine A sont deux composantes essentielles pour le fonctionnement normal de la prostate. L'absence d'androgène ou d'AR entraîne la régression de la prostate (Wolbach *et al.*, 1925; Kyprianou *et al.*, 1988). Il a été rapporté que les transcrits d'ARNm de RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$  sont abondants dans la prostate de rat et que le niveau de ces transcrits est négativement régulé par la testostérone (Huang *et al.*, 1997). Par contre, dans des cellules humaines de cancer de la prostate, le traitement à la testostérone amène une augmentation de l'ARNm de RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$  (Li *et al.*, 2002). Ces différents résultats proposent que les processus médiés par les RARs seraient impliqués dans la régulation des cellules prostatiques par les androgènes et que cette régulation peut changer pour mener au développement du cancer.

Il semblerait que l'AR peut induire la transcription de l'ARNm des récepteurs aux androgènes (Zhao *et al.*, 1999). De plus, l'AR 9-*cis* inhibe la croissance de cellules humaines de cancer de la prostate de façon synergique avec le 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ , un dérivé de la vitamine D, par un mécanisme dépendant des androgènes (Zhao *et al.*, 1999).

### **1.6.3 L'acide rétinoïque et la $\beta$ -caténine dans le cancer de la prostate**

Les agents servant à prévenir le développement d'une lésion cancéreuse déjà existante, comme les vitamines A et D, sont utilisés dans les premiers stades du cancer, mais perdent de leur efficacité plus le cancer est avancé. Plusieurs études ont été effectuées dans le but d'identifier les causes de cette résistance à la vitamine A. Il a d'abord été proposé que l'AR inhiberait la tumorigénèse en affectant directement la transactivation par le complexe transcriptionnel  $\beta$ -caténine-LEF/TCF (Easwaran *et al.*, 1999) et/ou en augmentant l'expression et la fonction des cadhérines (Byers *et al.*, 1996). L'augmentation de l'expression des cadhérines a pour effet de diminuer le pool de  $\beta$ -caténine cytoplasmique (Fagotto *et al.*, 1996) et ainsi inhiber la formation du

complexe transcriptionnel avec LEF/TCF. Une autre fonction attribuée aux rétinoïdes est celle d'inhiber l'activité de l'oncogène AP-1. AP-1 est constitué des proto-oncogènes *jun* et *fos* et leurs activités sont associées à la prolifération cellulaire et à la transformation néoplasique. L'équipe du Dr Byers a tenté d'éclaircir le mécanisme de transrépression de l'activité de la  $\beta$ -caténine par les RARs activés. Il a été démontré que la transrépression est due à l'interaction du coactivateur p300 avec RA/RARs (Shah *et al.*, 2003). Donc, l'activité anti-cancer de la vitamine A est due à son activité anti-proliférative et pro-différentiation, mais la résistance de certains cancers avancés pourrait plutôt être due à un défaut dans la transrépression de l'activité de la  $\beta$ -caténine via les RARs activés et p300, entres autres.

Comme vu précédemment, les récepteurs aux androgènes jouent un rôle primordial dans le cancer de la prostate et une  $\beta$ -caténine constitutivement active a été retrouvée dans certains cas de cancer de la prostate. Il a été découvert que la  $\beta$ -caténine augmente l'activité des récepteurs aux androgènes (Truica *et al.*, 2000) en présence de ligand. Dans le cas d'une  $\beta$ -caténine stabilisée dans des cellules cancéreuses, il y aurait une augmentation de l'activité des récepteurs aux androgènes par la  $\beta$ -caténine, ce qui contribuerait à la progression du cancer. Un autre mécanisme consistant à la perte de E-cadhérine dans la progression d'un cancer contribuerait à augmenter le pool de  $\beta$ -caténine cytoplasmique, ce qui entraînerait une translocation de la  $\beta$ -caténine au noyau et une augmentation de l'activité des récepteurs aux androgènes. Toutes ces hypothèses ont été renforcées par la découverte d'une interaction directe entre la  $\beta$ -caténine et les récepteurs aux androgènes (Song *et al.*, 2003). En effet, la région à proximité du domaine N-terminal de transactivation AF-2 interagit directement avec la  $\beta$ -caténine, ce qui contribuerait à la croissance de cellules cancéreuses de la prostate (Masiello *et al.*, 2004). Par contre, cette interaction inhibe la formation du complexe transcriptionnel  $\beta$ -caténine-LEF/TCF par la compétition des récepteurs aux androgènes et des facteurs LEF/TCF pour la  $\beta$ -caténine (Mulholland *et al.*, 2003), ce qui aurait pour conséquence d'inhiber la transcription via LEF/TCF. Ces derniers résultats peuvent être intéressants au niveau du traitement du cancer de la prostate où une hyperactivation de la voie canonique des Wnt est en cause. Un traitement augmentant la transcription des récepteurs aux androgènes pourrait permettre de diminuer la progression du cancer en créant une compétition avec les facteurs LEF/TCFs pour la  $\beta$ -caténine.

## 1.7 Hypothèse

Comme discuté précédemment, l'AR et les RARs sont des molécules essentielles dans différents processus développementaux, établis par les différents *knockout*. L'absence de RAR $\gamma$  chez la souris entraîne des défauts entre autres au niveau de la prostate et des vésicules séminales, menant à la stérilité. Ces défauts se reflètent par une métaplasie squameuse souvent avec kératinisation. Nous nous sommes intéressés aux événements moléculaires responsables de ce phénotype.

Comme première piste, nous nous sommes intéressés à l'état de la voie canonique des Wnt dans la prostate et les vésicules séminales des mutants *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>*. Puisque le manque de RAR $\gamma$  (Lohnes *et al.*, 1993) et l'expression d'une  $\beta$ -caténine stabilisée (Miyoshi *et al.*, 2002; Gounari *et al.*, 2002; Bieri *et al.*, 2003) démontrent le même phénotype, nous avons émis comme hypothèse que le manque de RAR $\gamma$  pourrait influencer la voie canonique des Wnt. Nous nous sommes intéressés aux mécanismes possibles de régulation de la  $\beta$ -caténine par l'AR dans la prostate. Toujours dans le but de trouver des molécules responsables de la métaplasie observée dans la prostate des souris *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>*, le facteur de croissance IGF-I a attiré notre attention vu son rôle important dans le développement et le cancer de la prostate. De plus, le facteur IGF-I augmenterait l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux androgènes en présence de la  $\beta$ -caténine. Nous nous sommes penchés sur son expression dans les souris *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>*.



## Chapitre 2

### ***Matériels et méthodes***

## 2.1 Animaux

Les souris mâles  $RAR\gamma^{+/-}$  utilisées dans cette étude ont déjà été décrites (Lohnes *et al.*, 1993). Les souris nulles ont été générées par des croisements entre des souris hétérozygotes. Les souris  $TCF-LacZ$  ont aimablement été données par D. Dufort (Liu *et al.*, 2003) et les souris  $RARCLPE2$ , par J. Rossant (Rossant *et al.*, 1991). Les souris mâles CD-1 ont été obtenues de Charles River.

## 2.2 Traitement des animaux

Les souris mâles  $RAR\gamma^{+/-}$  et CD-1 âgées de deux à six semaines ont été traitées par gavage avec 100 mg/kg d'AR tout-*trans* (Sigma) ou avec une solution de 10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma), dilués dans de l'huile de maïs. Les animaux ont été sacrifiés et le TGM ou la prostate a été retiré au temps indiqué, après le gavage.

## 2.3 Immunohistochimie

Les TGM de souris  $RAR\gamma^{+/-}$  ou CD-1 âgées de deux à six semaines ont été fixés dans du 4% paraformaldéhyde/PBS pendant 16 h à 4°C, enrobés dans de la paraffine et sectionnés à 7  $\mu$ m. L'immunohistochimie a été effectuée comme déjà décrit (Attar *et al.*, 1997). Brièvement, après déparaffinisation et réhydratation, les sections ont été bloquées avec 10% de sérum de chèvre (Sigma) dans du PBS/0.2% Tween-20 pour une heure à température ambiante. Ensuite, les sections ont été hybridées avec l'anticorps primaire ( $\beta$ -caténine : Transduction Laboratories, dilution 1 : 250; IGF-I : Santa Cruz, dilution 1 : 25) à 4°C pendant 16 h. Les sections ont été lavées trois fois dans du PBS/0.2% Tween-20 et bloquées à nouveau dans du 10% sérum de chèvre dilué dans du PBS/0.2% pour une heure à la température ambiante. Les sections sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé (anti-souris et anti-lapin : Vector Laboratory, 1 : 500) pour une heure à température ambiante. Les échantillons ont été lavés et incubés avec la peroxidase horseradish couplé à la streptavidine (Streptavidin-HRP, Perkin-Elmer) dilué 1 : 1000 pendant 1 heure. La réaction a été révélée par l'incubation des sections avec une solution de diaminobenzidine (DAB, Sigma) dans du TBS (DAB, 0.05%; imidazole, 0.01 M;  $NiCl_2$ , 0.064%;  $H_2O_2$ , 0.06%)

pendant 8 minutes. Les sections ont été contrecolorées au vert de méthyl (Sigma) avant d'être montées avec du Permount (Fisher).

## 2.4 Hybridation *in situ*

Les TGM de souris *RAR $\gamma$*  âgées de deux à six semaines ont été fixés dans du 4% paraformaldéhyde/PBS pendant 16 h à 4°C, enrobés dans de la paraffine et sectionnés à 7  $\mu$ m. L'hybridation *in situ* a été effectuée comme déjà décrit (Wu *et al.*, 2001). Toutes les solutions utilisées ont été traitées au diéthyl pyrocarbonate (DEPC, ICN) ou faites à partir d'eau traitée. Brièvement, après déparaffinisation, réhydratation et déshydratation, les sections ont été digérées avec de la protéinase-K (1  $\mu$ g/ml dans 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA) pendant 20 minutes à température ambiante. La réaction a été arrêtée dans une solution de glycine/PBS. Les sections ont été fixées de nouveau dans du 4% paraformaldéhyde/PBS et ensuite, elles ont été acétylées dans une solution d'acétique anhydre (Sigma) dilué 1 : 400 dans du 0.1 M triéthanolamine (Sigma) pour 10 minutes. Après un lavage dans du PBS, les sections ont été déshydratées et séchées à l'air. La sonde d'ARN a été synthétisée à partir du vecteur pGEMT-IGF-I et marquée à la digoxigénine-11-uridine-5'-triphosphate (DIG, Roche) comme déjà décrit (Wilkinson, 1992). La sonde a été diluée à une concentration de 1  $\mu$ g/ml dans une solution d'hybridation (10 mM Tris-HCl pH7.5, 50% formamide déionisé, 0.6 M NaCl, 1 mM EDTA, 1X Denhardt's, 1  $\mu$ g/ml ARNt, 10% dextran sulfate, 10 mM dithiothreitol) a été dénaturées et appliquée sur les sections pendant 16h à 42°C dans une chambre humidifiée. Après deux lavages dans du 4XSSC et 2XSSC, les sections ont été bloquées dans une solution de 0.1% Triton X-100, 2% sérum de chèvre dans du TBS et hybridées avec un anticorps anti-DIG couplé à l'alkaline-phosphatase (fragment Fab, Roche) dilué 1 : 500 dans la solution de blocage pendant 3h. La détection a été faite par l'incubation des sections dans une solution de nitrobleu tétrazolium salt (NBT) et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) (0.34 mg/ml NBT, 0.175 mg/ml BCIP, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) de 1-4 h. Les sections ont ensuite été montées dans un milieu aqueux 90% glycérol/PBS.

## 2.5 Coloration au X-Gal

Les TGM des souris RARCLPE2 et *TCF-LacZ* âgées de deux à six semaines ont été fixés dans du 4% paraformaldéhyde/PBS pendant 16 h à 4°C, enrobés dans du Cryomatrix (ThermoShandon) et sectionnés à 12 µm. Brièvement, les sections ont été fixées 7 minutes dans 4% paraformaldéhyde dilué dans la solution de fixation (100 mM sodium phosphate pH 7.4, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>). Après plusieurs passages dans la solution de lavage (0.1 M sodium phosphate pH 7.4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% Nonidet P-40), l'activité  $\beta$ -galactosidase a été révélée en incubant les sections dans la solution de détection (1 mg/ml de X-Gal (Invitrogen), 5 mM de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>-6 H<sub>2</sub>O) à 37°C pendant 16 h. Les sections ont ensuite été lavées dans la solution de lavage préchauffée à 37°C et ensuite dans le PBS. Les sections ont été séchées à l'air et montées dans un milieu aqueux.

## 2.6 Constructions plasmidiques

Le vecteur d'expression  $\beta$ -caténine/Flag a été donné par David Rimm tandis que LEF1-HA a été donné par Liliana Attisano. Toutefois, le vecteur rapporteur de l'activité du récepteur aux androgènes PSA-Enh-E4TATA-luciférase (renommé PSA-Luc) (Cleutjens *et al.*, 1996) et le vecteur d'expression pCMV-hAR (Song *et al.*, 2003) ont été fournis par Elizabeth M. Wilson. Pour ce qui est des vecteurs rapporteurs de l'activité de LEF/TCF pGL3-OT et son vecteur contrôle pGL3-OF, ils ont été donnés par Bert Vogelstein. Les vecteurs contrôles pRc-CMV et pGL3 de Promega ont été utilisés pour la normalisation lors des transfections. Le vecteur pGEMT-IGF-I a été construit par amplification de l'ARNm de IGF-I par RT-PCR à partir de l'ARN total de foie de souris avec les amorces 5'TGA GGC TCA AGG TAT TTC CC3' et 5'TCT GAG GTG TTA CAC TTC CC3' amplifiant les aa 978 à 2051, et cloné dans pGEMT (Promega).

## 2.7 Culture cellulaire et transfections

Les cellules de prostate humaine LNCaP ont été propagées dans du milieu MEM (Gibco) supplémenté de 10% sérum bovin fétal (FBS, Gibco), de L-glutamine (2 mM, Gibco), de pénicilline (100 U/ml, Gibco) et de streptomycine (100 µg/ml, Gibco) et maintenues dans les conditions standards de culture.

Le milieu conditionné Wnt3a (Shibamoto *et al.*, 1998) a été préparé à partir de lignées stables de cellules L (fibroblastes de souris) intégrant l'ADNc de Wnt3a. Ces cellules ont été entretenues dans du milieu DMEM (Life Technologies) supplémenté en glucose (4.5g/L), 10% FBS et gentamicine (10 µg/ml) dans les conditions standards de culture. Le milieu a été prélevé à deux et quatre jours après l'ensemencement et conservé à -80°C. L'analogue de la testostérone, le méthyltrienolone (R1881, Perkin-Elmer) et l'AR tout-*trans* ont été dissout dans du diméthyl sulfoxyde.

Pour les transfections transitoires, environ  $1 \times 10^5$  cellules LNCaP ont été ensemencées dans des plaques de six puits contenant du milieu MEM supplémenté avec 10% FBS passé sur du charbon (charcoal-stripped FBS, Wisent), L-glutamine (2 mM), penicilline (100 U/ml) et streptomycine (100 µg/ml), à l'exception des cellules qui seront traitées avec du milieu conditionné Wnt3a, qui ont été passées dans le milieu d'entretien. Le jour suivant, les cellules ont été transfectées par lipofection (7.5 µl de lipides/puits) avec la quantité d'ADN spécifiée. Les cellules ont été traitées 16h après la transfection.

Les cellules ont été lysées dans 250 µl de tampon de lyse (0.1 M Tris pH 8, 1% Igepal, 1 mM dithiothreitol) et le lysat a été analysé pour l'activité luciférase avec un luminomètre AutoLumat LB953 (Berthold Technologies).

Pour l'analyse par coimmunoprécipitation, environ  $2-3 \times 10^5$  cellules ont été passées dans des plaques de 100 mm dans du milieu avec 10% FBS passé sur du charbon et transfectées avec 55 µl de lipides par plaque avec 16 µg d'ADN. Les cellules ont été traitées 16 h après la transfection.

## **2.8 Extraits totaux de protéines**

### **2.8.1 À partir de cellules en culture**

Les cellules LNCaP ont été lysées dans du tampon 1% Tx-100 (20 mM Tris pH 8, 25 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 10% glycérol, 1% Triton X-100, 1mM dithiothreitol, inhibiteurs de protéases) pendant 30 minutes. Après centrifugation, les protéines du surnageant ont été dosées selon la méthode DC Protein Assay (BioRad).

### **2.8.2 À partir de prostates**

Les extraits totaux de protéines de la prostate de souris CD-1 ont été faits à partir de prostate homogénéisée sur glace avec un homogénéisateur Tissue Tearor (Biospec Products) dans du tampon 1% Tx-100. Après une incubation de 45 minutes sur glace, les extraits ont été centrifugés et le surnageant a été dosé selon la méthode DC Protein Assay (BioRad).

### **2.9 Coimmunoprécipitation**

À partir des extraits cellulaires, un milligramme de protéines a été immunoprécipité pendant 16 h à 4°C avec 3 µl d'anticorps anti-récepteurs aux androgènes (Upstate) après un pré-clear de 1h30 avec 20 µl de billes de protéines A/G Agarose Plus (Santa Cruz Biotechnology). L'immunoprécipitation a été effectuée avec 20 µl de billes de protéines A/G Agarose-Plus pendant 2h. Les billes ont été lavées trois fois avec du tampon 1% Tx-100 et les protéines ont été résolues par une électrophorèse sur un gel 0.8% de polyacrylamide-sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE). Le Western Blot a ensuite été détecté selon la méthode ECL (Amersham-Pharmacia) avec un anticorps anti  $\beta$ -caténine (Transduction Laboratories) et un anticorps anti-récepteur aux androgènes (Santa Cruz Biotechnology) à une dilution 1 : 1000. La mesure de l'intensité des bandes a été effectuée avec le programme Image Quant.

## Chapitre 3

### ***Résultats***

### 3.1 Progression de la métaplasie chez les souris $RAR\gamma^{-/-}$

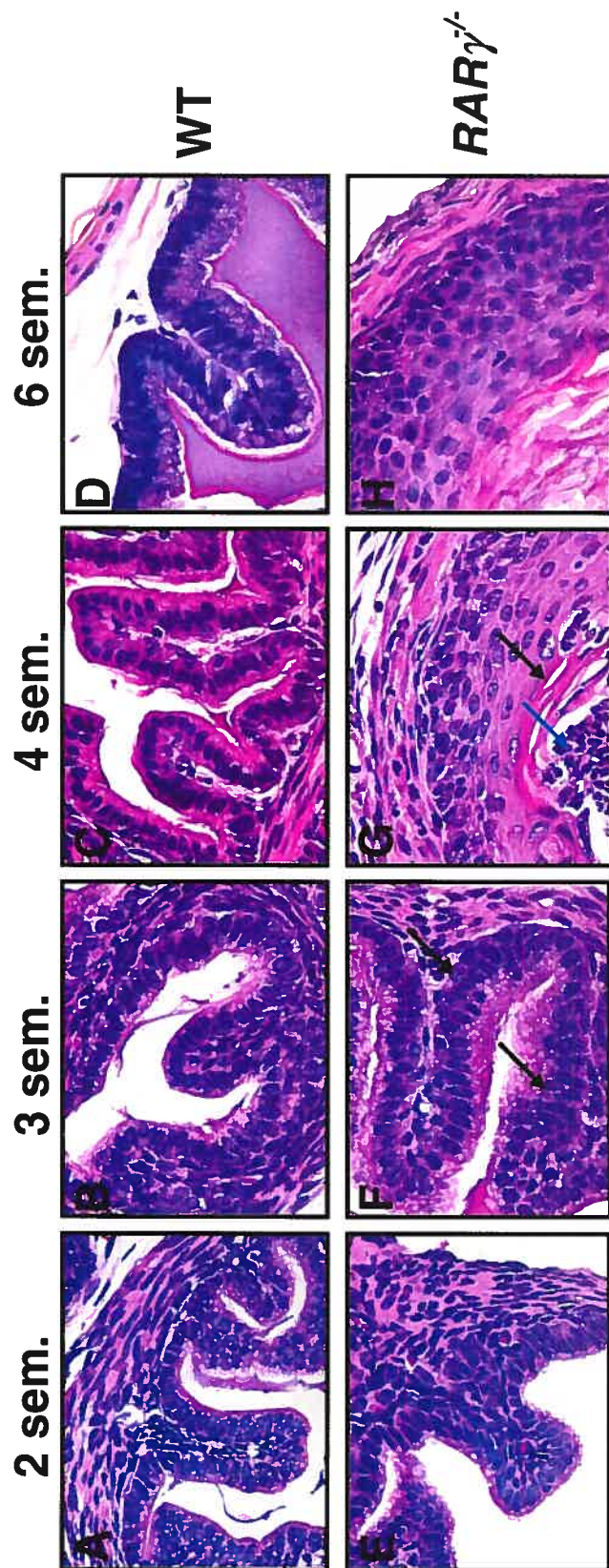
Afin de déterminer l'âge auquel la métaplasie apparaît, nous avons sacrifié des souris  $RAR\gamma^{-/-}$  et WT âgées de deux, trois, quatre et six semaines. Le TGM de chaque souris a été fixé, enrobé dans la paraffine, sectionné et contrecoloré afin de comparer par microscopie le phénotype des vésicules séminales. Chez les souris âgées de deux semaines, on observe un épithélium simple cylindrique avec un noyau basal autant chez le mutant que chez le WT (figure 3-1A, E). Par contre, dès la troisième semaine après la naissance, il y a une désorganisation de l'épithélium qui débute chez la souris  $RAR\gamma^{-/-}$ . Ceci se reflète par un début de stratification (figure 3-1F, flèches) et un noyau plus central comparé au WT correspondant. Chez les souris nées âgées de quatre semaines, on n'observe plus l'épithélium simple cylindrique retrouvé chez la souris WT (figure 3-1C), mais plutôt un épithélium stratifié et kératinisé (figure 3-1G, flèche noire), représenté par plusieurs couches de cellules plates ressemblant aux couches supérieures de la peau. On observe même une accumulation de lymphocytes dans la lumière des vésicules séminales (figure 3-1G, flèche bleue), caractéristique de l'inflammation. Le phénotype de la métaplasie est bien établi dans les vésicules séminales des souris  $RAR\gamma^{-/-}$  âgées de six semaines (figure 3-1H) avec une perte totale de l'épithélium simple et une production intense de kératine, comparativement au WT correspondant (figure 3-1D).

Cette expérience nous a permis d'établir que la métaplasie au niveau des vésicules séminales débute chez les souris  $RAR\gamma^{-/-}$  âgées entre deux et trois semaines. Les mêmes stades ont donc été utilisés dans les expériences subséquentes.

### 3.2 Expression de la $\beta$ -caténine chez les souris $RAR\gamma^{-/-}$

La stabilisation de la  $\beta$ -caténine par la délétion de l'exon 3 responsable de son ciblage au protéasome provoque une transdifférentiation de la prostate (Gounari *et al.*, 2002; Bieri *et al.*, 2003) semblable à la métaplasie observée chez les mutants  $RAR\gamma^{-/-}$ . L'absence de  $RAR\gamma$  semble donc influencer la voie canonique des Wnt. Nous nous sommes ainsi intéressés à l'expression de la  $\beta$ -caténine dans la prostate et les vésicules séminales des mutants  $RAR\gamma^{-/-}$  comparativement au WT (figure 3-2). Cette analyse s'est faite par des expériences d'immunohistochimie avec un anticorps





**Figure 3-1. Phénotype des vésicules séminales de souris  $RAR\gamma^{-/-}$ .**

Coloration hématoxyline-éosine de sections de vésicules séminales de souris mâles WT (A-D) et  $RAR\gamma^{-/-}$  (E-H) âgées entre deux et six semaines. L'épithélium des vésicules séminales des souris WT est simple cylindrique avec un noyau plutôt basal (A-D). On remarque un début de désorganisation au niveau de l'épithélium chez les souris nulles âgées de trois semaines (F), qui se traduit par un noyau plus central et une perte de l'épithélium simple (flèches). Chez les souris  $RAR\gamma^{-/-}$  âgées de quatre semaines (G), l'épithélium est stratifié et kératinisé (flèche noire) avec une accumulation de lymphocytes dans la lumière de la glande (flèche bleue). 400X.

primaire contre la  $\beta$ -caténine (figure 3-2). Au niveau des vésicules séminales d'abord, il y a une plus forte expression de la  $\beta$ -caténine dans l'épithélium du mutant nul âgé de deux semaines comparativement au WT (figure 3-2A,E). Par contre, à trois semaines après la naissance, on observe une baisse de l'expression de la  $\beta$ -caténine chez le mutant comparativement au WT (figure 3-2B, F), chez lequel la  $\beta$ -caténine est très concentrée au niveau des jonctions cellulaires de l'épithélium et peu dans le noyau. Toutefois, l'expression est plus élevée chez la souris  $RAR\gamma^{-/-}$  âgée de trois semaines comparativement à celle âgée de deux semaines (figure 3-2E, F). Chez les souris âgées de quatre et six semaines, la différence au niveau de l'expression de la  $\beta$ -caténine entre les souris nulles et WT est probablement due au changement de type cellulaire et tissulaire chez les souris  $RAR\gamma^{-/-}$  (figure 3-2C, D, G, H).

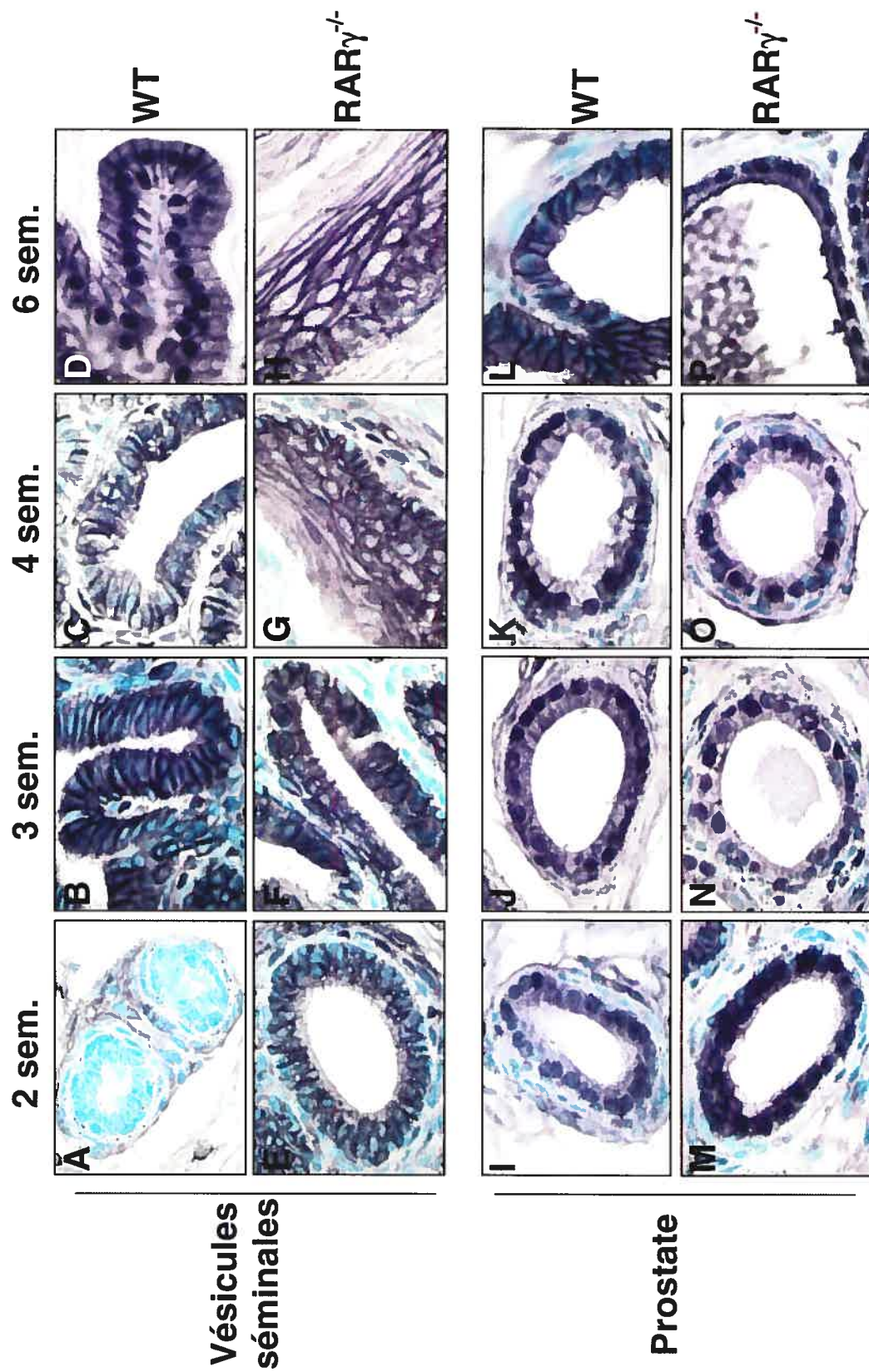
Même si le phénotype métaplasique apparaît plus tard dans la prostate (Lohnes *et al.*, 1993), nous nous sommes intéressés au niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine aux mêmes stades dans cet organe puisqu'il partage plusieurs caractéristiques communes avec les vésicules séminales. En effet, le phénotype de la prostate des souris  $RAR\gamma^{-/-}$  décrit par Lohnes *et al.* est en tout point identique à celui observé dans les vésicules séminales des mêmes mutants. Nous avons constaté que le patron d'expression de la  $\beta$ -caténine dans la prostate est très semblable à celui observé dans les vésicules séminales. L'expression de la  $\beta$ -caténine est plus élevée chez la souris  $RAR\gamma^{-/-}$  âgée de deux semaines comparativement au WT du même âge (figure 3-2I, M). Le niveau de la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme est plus faible chez la souris mutante âgée de trois semaines si on compare au WT (figure 3-2J, N). Cette différence s'atténue chez la souris âgée de quatre semaines où on observe un peu moins de  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme de la souris  $RAR\gamma^{-/-}$  comparativement au WT (figure 3-2K, O). Six semaines après la naissance, la  $\beta$ -caténine est plus concentrée au niveau des jonctions cellulaires et peu dans le noyau chez la souris WT (figure 3-2L). Chez les souris mutantes, l'expression de la  $\beta$ -caténine semble augmenter comparativement au stade précédent (figure 3-2O, P).

Ces résultats montrent une diminution de l'expression de la  $\beta$ -caténine et/ou une relocalisation de celle-ci au début de la transdifférentiation (deux semaines) chez la souris  $RAR\gamma^{-/-}$  comparé au WT. Ce phénomène n'a été observé que dans l'épithélium des vésicules séminales et de la prostate et non dans le stroma.

**Figure 3-2. Expression de la  $\beta$ -caténine dans les vésicules séminales et la prostate de souris  $RAR\gamma^{-/-}$ .**

Immunohistochimie de sections de vésicules séminales (A-H) et de prostate (I-P) de souris WT (A-D, I-L) et  $RAR\gamma^{-/-}$  (E-H, M-P) avec un anticorps primaire anti- $\beta$ -caténine. Il y a une plus grande expression de la  $\beta$ -caténine chez la souris nulle âgée de deux semaines autant au niveau des vésicules séminales (E) que de la prostate (M), comparativement aux souris WT respectives (A,I). Chez la souris nulle âgée de trois semaines, l'expression de la  $\beta$ -caténine est plus faible dans les vésicules séminales (F) et la prostate (N) comparativement au WT (B,J) où l'expression semble être concentrée au niveau des jonctions cellulaires dans les vésicules séminales (B) et dans le cytoplasme pour la prostate (J). Les vésicules séminales des souris âgées de quatre et six semaines présentent un phénotype métaplasique, ce qui peut expliquer la différence d'expression de la  $\beta$ -caténine observée entre les souris  $RAR\gamma^{-/-}$  (G,H) et WT (C,D). Au niveau de la prostate de la souris âgée de quatre semaines, l'expression de la  $\beta$ -caténine est plus forte dans le cytoplasme de la souris WT (K) comparativement à la souris nulle (O) tandis que la  $\beta$ -caténine de la prostate de la souris nulle âgée de six semaines (P) est plus retrouvée au niveau des noyaux comparé au WT (L) où la  $\beta$ -caténine est localisée dans les jonctions cellulaires.



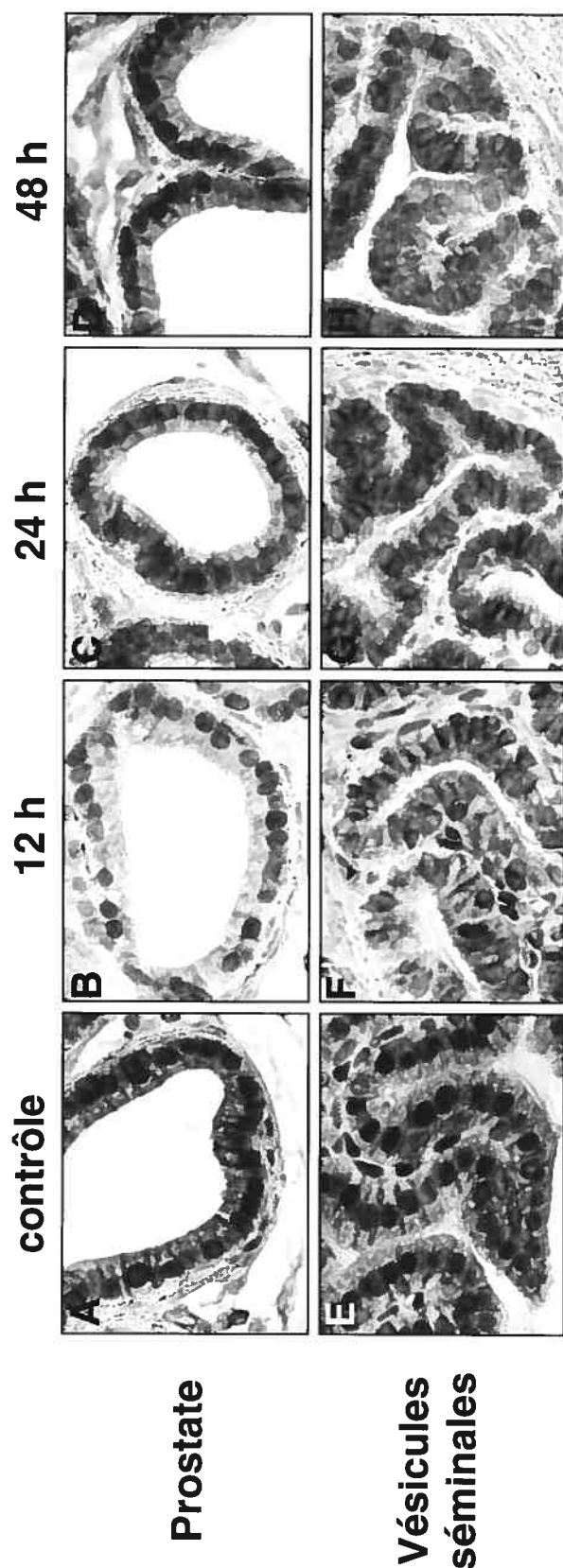


### 3.3 Effet de l'AR sur l'expression de la $\beta$ -caténine

Selon les résultats précédents, l'absence de RAR $\gamma$  semble influencer la voie canonique des Wnt. En effet, l'expression de la  $\beta$ -caténine, un joueur central de la voie canonique des Wnt, semble être diminuée chez les mutants *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>* juste avant le début de l'apparition de la métaplasie. Par la suite, nous avons tenté de voir si l'AR pouvait effectivement avoir un effet sur la  $\beta$ -caténine de la prostate et des vésicules séminales. Pour ce faire, nous avons gavé des souris WT âgées de trois semaines avec de l'AR à une concentration de 100 mg/kg. Après 12, 24 et 48 heures de traitement, nous avons retiré le TGM qui a été fixé, enrobé et sectionné avant d'effectuer l'analyse de l'expression de la  $\beta$ -caténine par immunohistochimie.

La souris contrôle a été sacrifiée au temps zéro, correspondant au début de l'expérience de gavage, pour laquelle on observe une forte expression de la  $\beta$ -caténine dans le noyau et le cytoplasme (figure 3-3A, E). Douze heures après le gavage, on observe un fort effet inhibiteur de l'AR sur l'expression de la  $\beta$ -caténine tant au niveau de la prostate que des vésicules séminales (figure 3-3B, F). La  $\beta$ -caténine semble être plus concentrée au niveau des jonctions cellulaires des vésicules séminales (figure 3-3F). Après 24 heures de traitement à l'AR, l'effet inhibiteur sur la  $\beta$ -caténine s'estompe et redevient au niveau du contrôle pour la prostate 48h après le traitement. Pour les vésicules séminales, il ne semble pas y avoir de différence après 48h de traitement comparativement à 24h, mais l'effet inhibiteur de l'AR sur la  $\beta$ -caténine observé à 12h de traitement semble diminuer.

Ces résultats montrent clairement un effet inhibiteur de l'AR sur l'expression de la  $\beta$ -caténine dans l'épithélium de la prostate et des vésicules séminales. L'effet inhibiteur de l'AR sur la voie canonique des Wnt a déjà été décrit dans la littérature (Easwaran *et al.*, 1999), mais aucun changement dans le pool cytoplasmique et nucléaire n'a été rapporté lors de cette étude. C'est donc la première fois qu'on démontre l'effet inhibiteur de l'AR sur l'expression de la  $\beta$ -caténine dans la prostate de souris.



**Figure 3-3. Effet de l'acide rétinoïque sur l'expression de la  $\beta$ -caténine.**

Immunohistochimie avec un anticorps primaire anti- $\beta$ -caténine sur des sections de prostate (A-D) et de vésicules séminales (E-H) de souris WT âgées de trois semaines gavées à l'AR. On remarque une forte expression de la  $\beta$ -caténine dans le noyau des sections de prostate et de vésicules séminales des souris contrôles non-gavées (A, E). Après un traitement de 12 h, l'expression de la  $\beta$ -caténine a diminué tant au niveau de la prostate (B) que des vésicules séminales (F). Après 24 h de traitement, l'expression de la  $\beta$ -caténine a augmenté comparativement à 12h de traitement autant pour la prostate (C comparé à B) que les vésicules séminales (G comparé à F) et le niveau de  $\beta$ -caténine de la prostate redevient semblable au contrôle (A) 48 h après le gavage (D). L'expression de la  $\beta$ -caténine est plus faible dans les vésicules séminales comparé au contrôle (E) même après 48 h de traitement (H). 400X.

### **3.4 Site d'activité biologique de l'AR**

Nous avons vu précédemment que l'effet de l'AR sur l'expression de la  $\beta$ -caténine dans la prostate et les vésicules séminales des souris  $RAR\gamma^{-/-}$  âgées de trois semaines et chez les souris WT gavées à l'AR pendant 12h n'avait lieu que dans l'épithélium. Afin de confirmer ces résultats, nous avons cherché à identifier le site d'activité biologique de l'AR. Nous nous sommes donc procurés des souris RARE-LacZ rapportrices de l'activité de l'AR (Rossant *et al.*, 1991). Ces souris expriment le gène de la  $\beta$ -galactosidase (*LacZ*) sous le contrôle d'un promoteur contenant un RARE dans sa région régulatrice. L'activité de la  $\beta$ -galactosidase dans les vésicules séminales a été détectée par une coloration au X-Gal, produisant un précipité bleu.

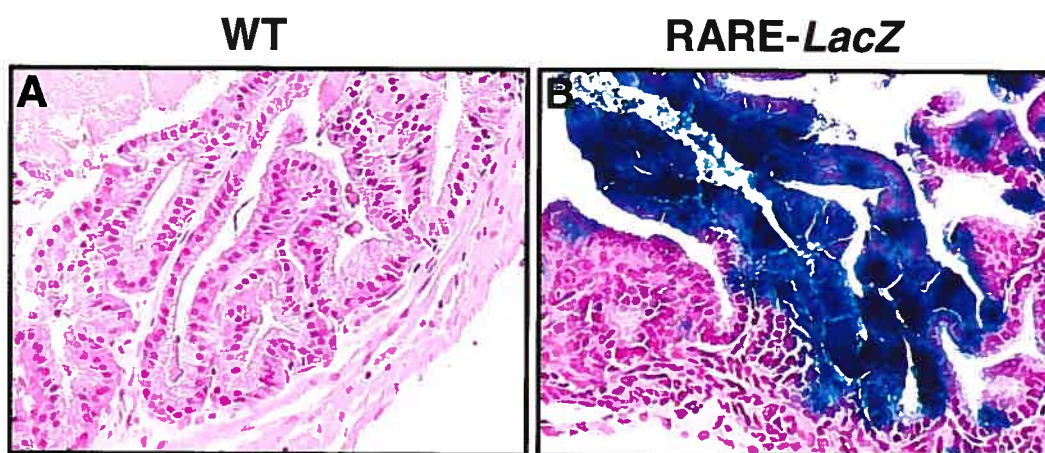
On remarque une absence totale d'activité  $\beta$ -galactosidase dans les vésicules séminales de la souris WT (figure 3-4A). Toutefois, l'épithélium des vésicules séminales de la souris RARE-LacZ est fortement coloré, associé à la présence de l'AR et de ces récepteurs dans ce type cellulaire.

Ces résultats concordent avec les observations précédentes selon lesquels l'influence de l'AR sur la  $\beta$ -caténine n'a lieu que dans l'épithélium, puisque l'AR lié aux RARs n'est présent que dans ce type cellulaire.

### **3.5 Activité de la voie canonique des Wnt dans la prostate**

Comme discuté précédemment, la  $\beta$ -caténine est une composante centrale de la voie canonique des Wnt. Suite aux résultats précédents, nous nous sommes intéressés à l'activité de la voie canonique des Wnt dans la prostate et les vésicules séminales afin de déterminer si l'influence de l'AR sur la  $\beta$ -caténine observée pouvait passer par la régulation de cette voie. Nous nous sommes procurés des souris rapportrices de l'activité de la voie canonique des Wnt, nommées LEF/TCF-LacZ. Ces souris expriment le gène de la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur ayant l'élément de réponse aux facteurs de transcription LEF/TCF dans sa région régulatrice.

Des souris TCF/LEF âgées de deux et trois semaines ont été sacrifiées, le TGM fixé, enrobé et sectionné afin de procéder à une analyse de l'activité  $\beta$ -galactosidase de la prostate et des vésicules séminales. Comme contrôle positif, nous avons prélevé



**Figure 3-4. Analyse du site d'activité des récepteurs à l'acide rétinoïque.**

Coloration au X-Gal de sections de vésicules séminales de souris WT (A) et de souris RARE-LacZ (B) reproductrices de l'activité des récepteurs à l'AR, âgées de quatre semaines. On remarque une forte activité des RARs dans l'épithélium des vésicules séminales des souris RARE-LacZ, noté par une coloration bleue, comparativement au WT. Cette activité est due à la présence d'AR dans l'épithélium.



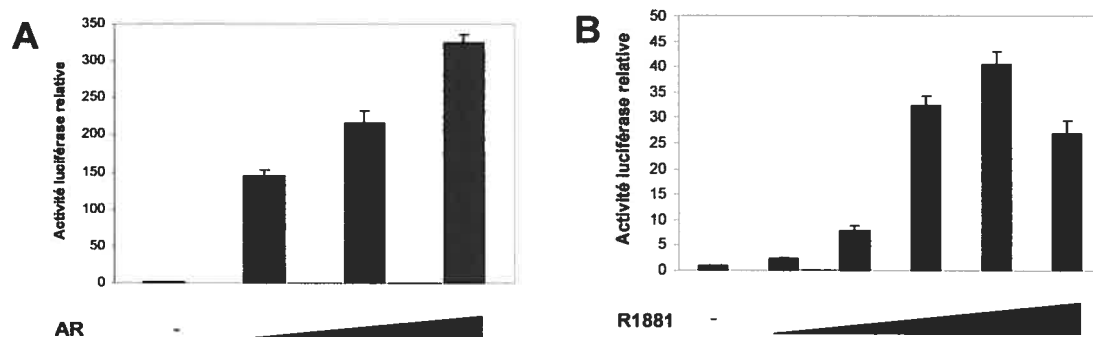
un morceau d'oreille qui a été traité comme les TGM. Une coloration au X-Gal a été faite sur les différentes sections et un précipité bleu s'est formé dans les follicules pileux du contrôle positif seulement (résultats non-montrés). Aucune coloration ne s'est formée sur les sections de prostate et de vésicules séminales des souris TCF/LEF-LacZ (résultats non-montrés). L'absence d'activité détectable de la voie canonique des Wnt dans la prostate suggère une autre voie de régulation de la  $\beta$ -caténine par l'AR dans cet organe.

### **3.6 Évaluation du modèle cellulaire LNCaP**

Comme discuté précédemment, les récepteurs aux androgènes possèdent un rôle primordial dans le développement et le maintien de l'intégrité de la prostate. La littérature a déjà fait part que ces derniers interagissent directement avec la  $\beta$ -caténine (Song *et al.*, 2003). Nous voulions donc évaluer si l'AR peut influencer la  $\beta$ -caténine complexée aux récepteurs aux androgènes dans la prostate. Nous avons décidé de faire quelques études préliminaires dans un modèle cellulaire. Nous avons choisi les LNCaP qui sont des cellules humaines de cancer de la prostate. Ces cellules sont largement utilisées et bien caractérisées.

Afin de savoir si les LNCaP sont un bon modèle pour nos études, nous avons d'abord évalué si elles possèdent des RARs actifs (figure 3-5A). Pour ce faire, nous avons transfecté dans les LNCaP un vecteur rapporteur contenant trois RAREs en amont du gène de la luciférase (pD815). Nous avons ensuite traité les cellules avec différentes concentrations d'AR variant de 100 nM à 10  $\mu$ M et nous avons obtenu une forte activité luciférase. Les cellules LNCaP possèdent donc des RARs fonctionnels, ce qui était nécessaire dans la poursuite de nos études.

Les cellules LNCaP sont connues pour avoir une croissance androgène-dépendante, mais leurs récepteurs aux androgènes sont mutés. Nous avons donc dû nous assurer que les LNCaP répondent à la testostérone en leur transfectant 500 ng d'un vecteur codant pour des récepteurs aux androgènes humains fonctionnels (pCMV-hAR) (figure 3-5B). L'activité des récepteurs aux androgènes a été mesurée en co-transfectant un vecteur rapporteur luciférase (PSA-Luc). Suite à un traitement des cellules transfectées avec un analogue de la testostérone, le R1881, d'une concentration variant entre 10  $\mu$ M à 100 nM, nous avons obtenu une bonne induction de l'activité des récepteurs aux androgènes.



**Figure 3-5. Évaluation de la pertinence du modèle cellulaire LNCaP.**

Les cellules LNCaP possèdent des RARs fonctionnels, évalués par la transfection de 1  $\mu$ g de vecteur rapporteur RARE-Luc (pD815) dans les cellules traitées avec différentes concentrations d'AR variant de 0.1  $\mu$ M à 10  $\mu$ M (A). Les cellules LNCaP répondent au R1881 de concentration variant entre 0.01 nM et 100 nM lorsqu'elles sont transfectées avec 0,5  $\mu$ g de pCMV-hAR; l'activité androgénique rapportée par la transfection de 3  $\mu$ g du vecteur rapporteur PSA-Luc (B). L'activité luciférase a été mesurée 24h après le traitement

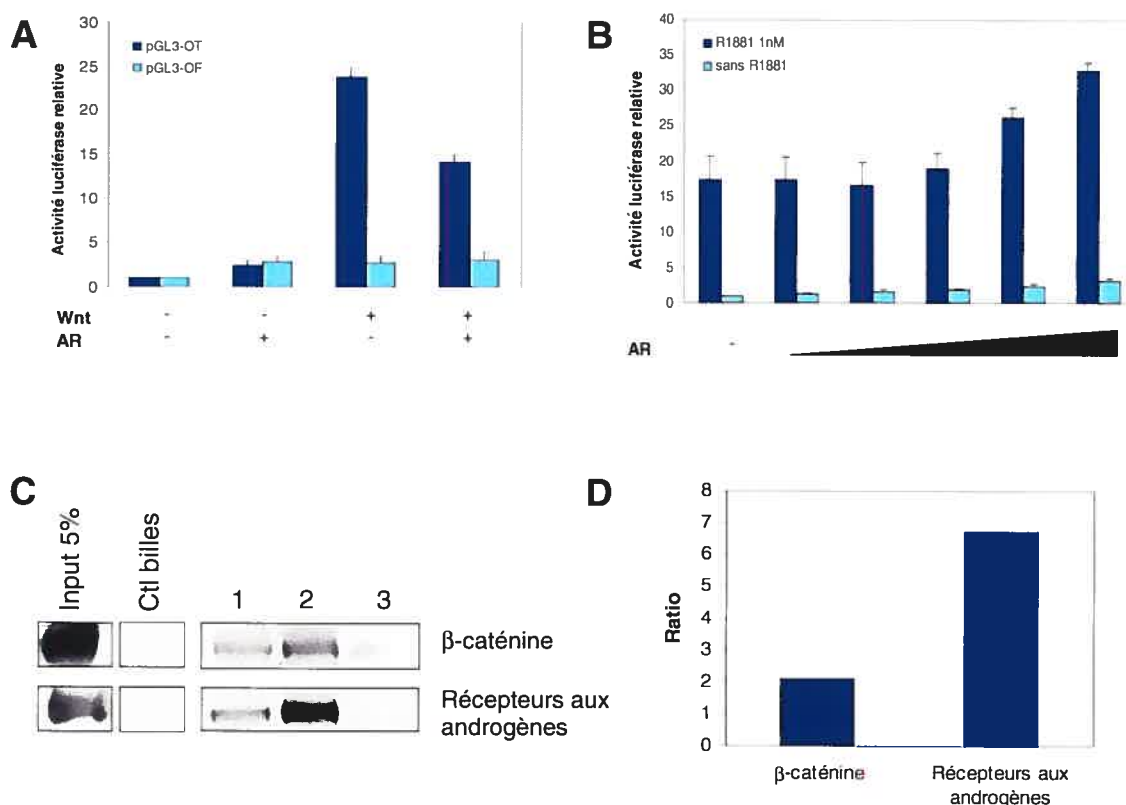
### **3.7 Influence de l'AR sur les récepteurs aux androgènes, $\beta$ -caténine et leur complexe**

Sachant que les LNCaP sont capables de répondre à l'AR et à la testostérone, nous avons pu tester si l'AR possède un effet sur la voie canonique des Wnt et sur l'activité des récepteurs aux androgènes.

Il a déjà été rapporté que l'AR influence l'expression des récepteurs aux androgènes (Zhao *et al.*, 1999) ainsi que la  $\beta$ -caténine complexée au facteur LEF-TCF (Easwaran *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2003). Nous avons cherché à savoir si tel était le cas dans les cellules de prostate. Nous avons d'abord transfecté les LNCaP avec un vecteur rapporteur de l'activité de la voie canonique des Wnt, pGL3-OT, ou son vecteur contrôle pGL3-OF. Nous avons ensuite traité les cellules avec du milieu conditionné Wnt et de l'AR (figure 3-6A). On remarque une diminution de l'activité de la voie canonique des Wnt avec un traitement à l'AR comparé à un traitement avec le milieu conditionné seulement, ce qui concorde avec la littérature.

Pour observer l'effet de l'AR sur l'activité des récepteurs aux androgènes, nous avons transfecté le vecteur rapporteur PSA-Luc ainsi que celui codant pour des récepteurs aux androgènes fonctionnels (PCMV-hAR) (figure 3-6B). Nous avons ensuite traité les cellules transfectées avec le R1881 et de l'AR. La comparaison de l'induction de l'activité des récepteurs aux androgènes par l'AR en présence et en absence de R1881 ne nous a permis d'observer aucune augmentation significative de l'activité androgénique en présence d'AR. Et même le calcul de l'induction relative révèle que l'AR diminuerait l'induction de l'activité des récepteurs aux androgènes par le R1881. En effet, l'activité relative en absence de R1881 augmente de 3,1 fois en présence de la plus forte concentration d'AR comparativement en l'absence d'AR et en présence de R1881, l'activité relative augmente de 1,9 fois pour la même concentration d'AR. Toutefois, l'augmentation de l'activité luciférase relative plus on augmente la concentration d'AR suggère que l'AR induit une augmentation de l'expression des récepteurs aux androgènes.

L'AR semble diminuer l'activité de la voie des Wnt et des récepteurs aux androgènes. Il est donc pertinent de vérifier si l'AR possède un effet inhibiteur sur la  $\beta$ -caténine complexée aux récepteurs aux androgènes. Cette expérience a été faite par coimmunoprécipitation du complexe avec un anticorps contre les récepteurs aux

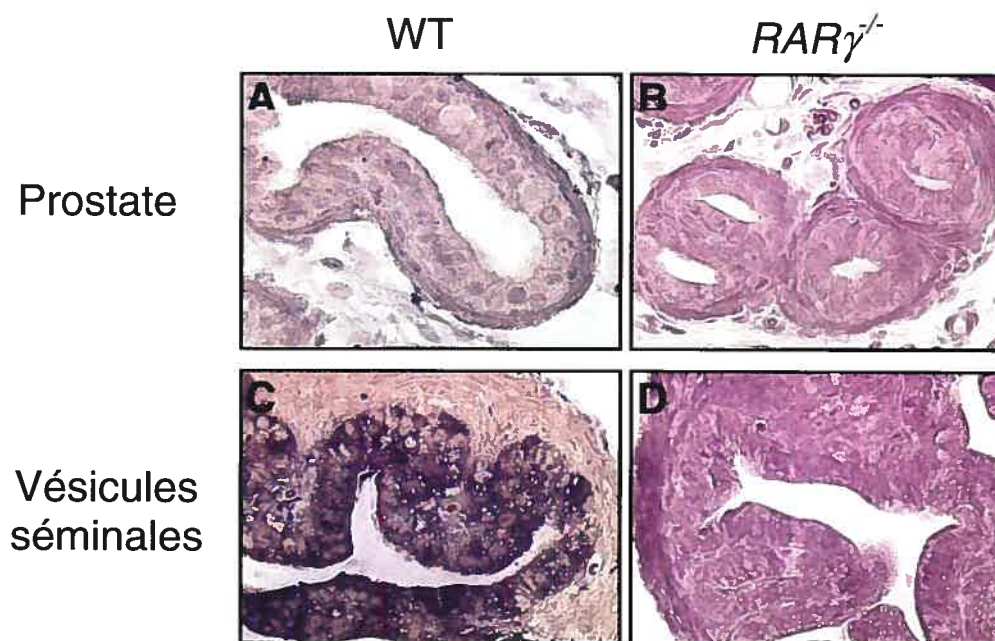


**Figure 3-6. Effet de l'acide rétinoïque sur la  $\beta$ -caténine, les récepteurs aux androgènes et leur complexe.**

Analyse de l'influence de l'AR sur la voie canonique des Wnt (A), sur l'activité des récepteurs aux androgènes (B) et sur la  $\beta$ -caténine complexée aux récepteurs aux androgènes (C, D). (A) L'AR diminue l'activité de la voie canonique des Wnt, évalué par la transfection de 1  $\mu$ g de vecteur rapporteur pGL3-OT ou pGL3-OF et par le traitement des cellules avec du milieu conditionné Wnt3a dans une proportion 1:1 avec du milieu de culture standard et/ou 1  $\mu$ M d'AR. (B) L'AR augmente l'expression des récepteurs aux androgène, mesurée par la transfection de 3  $\mu$ g de vecteur rapporteur PSA-Luc, 0,5  $\mu$ g de pCMV-hAR dans les cellules, traitées avec 1 nM R1881, mais diminue leur activité, mesuré par le calcul de l'induction relative. (C) Western blot d'une co-immunoprécipitation des récepteurs aux androgènes de cellules LNCaP transfectées avec (1) pCMV-hAR et  $\beta$ -caténine-Flag et traitées avec 1 nM de R1881, (2) pCMV-hAR et  $\beta$ -caténine-Flag et traitées avec 1 nM de R1881 et 1  $\mu$ M d'AR et (3)  $\beta$ -caténine-Flag et traitées avec 1 nM de R1881, montrant une forte augmentation de l'expression des récepteurs aux androgènes comparativement à l'augmentation de la  $\beta$ -caténine complexée. *Input* correspond à 50  $\mu$ g de protéines totales de cellules transfectées avec pCMV-hAR et  $\beta$ -caténine-Flag et traitées avec 1 nM de R1881, avant coimmunoprécipitation. Le contrôle billes correspond à la coimmunoprécipitation de 1 mg de protéines sans anticorps contre les récepteurs aux androgènes. (D) Mesure du ratio de l'intensité des bandes du Western Blot (C) du puits 2 par rapport au puits 1 avec ImageQuant montrant très peu d'effet de l'AR sur ce complexe par rapport à l'augmentation de l'expression des récepteurs aux androgènes.

androgènes et la  $\beta$ -caténine a été détectée par *Western Blot* (figure 3-6C). La  $\beta$ -caténine et les récepteurs aux androgènes ont été surexprimés dans les LNCaP qui ont ensuite été traitées au R1881 seulement (puits 1) et au R1881 et à l'AR (puits 2). Les protéines de ces cellules ont été extraites avant de procéder à la précipitation avec un anticorps contre les récepteurs aux androgènes. L'analyse de la quantité de  $\beta$ -caténine complexée aux récepteurs aux androgènes a été effectuée par *Western Blot*. On remarque que le traitement à l'AR augmente la quantité de  $\beta$ -caténine complexée aux récepteurs aux androgènes (puits 1, 2) ainsi que la quantité de récepteurs aux androgènes. Le puits 3 correspond aux LNCaP transfectées avec le vecteur  $\beta$ -caténine-Flag seulement et la faible bande que nous observons est due à la  $\beta$ -caténine complexée aux récepteurs aux androgènes endogènes. L'*input* correspond à 50  $\mu$ g de protéines totales de cellules surexprimant la  $\beta$ -caténine et les récepteurs aux androgènes traitées avec 1 nM de R1881 n'ayant subies aucune précipitation. On peut constater que la  $\beta$ -caténine et les récepteurs aux androgènes étaient bien surexprimés en grande quantité avant l'immunoprécipitation. Le contrôle billes consiste en un contrôle négatif où 1 mg de protéines totales de cellules surexprimant la  $\beta$ -caténine et les récepteurs aux androgènes traitées avec 1 nM de R1881 ont été en présence de billes seulement, sans anticorps contre les récepteurs aux androgènes. On remarque que la précipitation non-spécifique de la  $\beta$ -caténine et des récepteurs aux androgènes est presque absente.

Afin d'évaluer mathématiquement l'augmentation de la  $\beta$ -caténine complexée aux récepteurs aux androgènes suite à un traitement à l'AR, nous avons utilisé le programme ImageQuant. La photo du *Western Blot* a été numérisée et l'intensité des bandes a été évaluée par le programme. L'AR augmenterait de 2,1 fois la quantité de  $\beta$ -caténine complexée aux récepteurs aux androgènes, tandis que l'expression des récepteurs aux androgènes augmenteraient de 6,7 fois (figure 3-6D). La quantité de  $\beta$ -caténine étant limitante dans la formation du complexe  $\beta$ -caténine/récepteurs aux androgènes suite au traitement à l'AR, nous ne pouvons conclure que l'AR favorise la formation du complexe. Ces résultats représentent donc une diminution du ratio du complexe  $\beta$ -caténine/récepteurs aux androgènes suite au traitement à l'AR, ce qui suggère que l'AR n'aurait aucun effet sur la formation de ce complexe, malgré une forte augmentation de l'expression des récepteurs aux androgènes.



**Figure 3-7. Expression de l'ARNm de IGF-I dans les mutants  $RAR\gamma^{-/-}$ .**

Hybridation *in situ* de sections de prostate (A, B) et de vésicules séminales (C, D) de souris WT (A, C) et  $RAR\gamma^{-/-}$  (B, D) âgées de quatre semaines. On remarque une diminution de l'ARNm de IGF-I dans l'épithélium des deux organes chez le mutant (B, D) comparativement au WT (A, C), détecté avec une sonde anti-sens correspondant à l'ARNm complémentaire à IGF-I.

### 3.8 Expression de IGF-I dans les souris $RAR\gamma^{-/-}$

IGF-I est un facteur de croissance important dans le développement de la prostate et le maintien de son intégrité. Sachant que la présence d'IGF-I augmente l'activité des récepteurs aux androgènes en présence de la  $\beta$ -caténine (Verras *et al.*, 2004) et dans le but d'identifier des molécules et/ou des voies de signalisation importantes qui pourraient être dérégulées dans la prostate des mutants  $RAR\gamma^{-/-}$ , nous voulions déterminer l'expression de IGF-I dans la prostate des mutants comparativement au WT. Puisque la technique d'hybridation *in situ* est bien connue du laboratoire, nous avons d'abord cibler l'expression de l'ARNm de IGF-I.

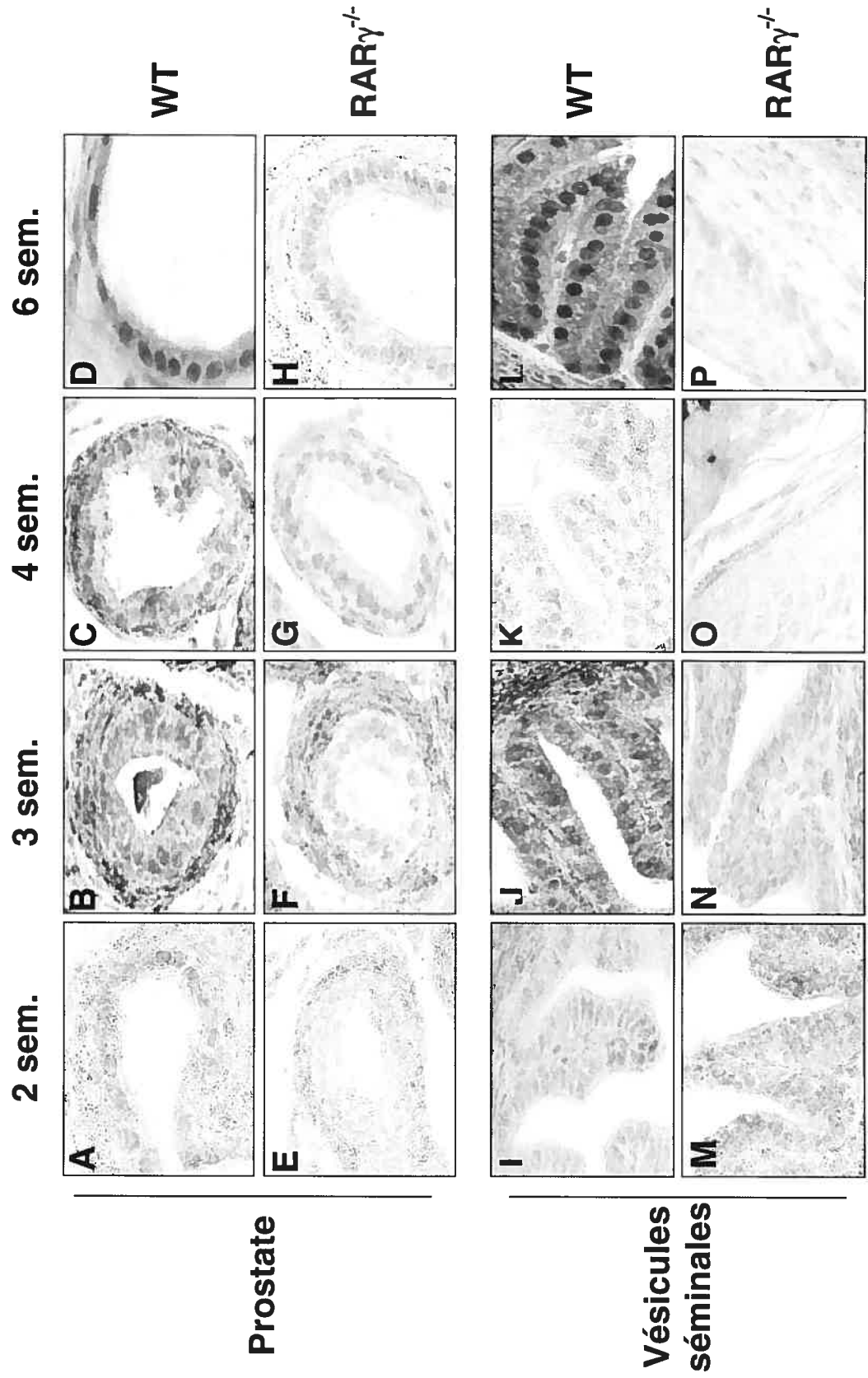
Pour ce faire, des TGM de souris WT et  $RAR\gamma^{-/-}$  ont été prélevés, fixés et sectionnés. Ensuite, les sections ont été hybridées avec une sonde anti-sens complémentaire à l'ARNm de IGF-I (figure 3-7A-D) marquée à la digoxigénine. L'hybridation avec la sonde contrôle du même sens que l'ARNm de IGF-I a aussi été faite comme contrôle négatif, mais vu l'absence de signal, les résultats ne sont pas montrés. On observe donc une diminution de l'ARNm dans la prostate (figure 3-7B) et les vésicules séminales (figure 3-7D) des souris  $RAR\gamma^{-/-}$  comparativement aux WT respectifs (figure 3-7A, C).

Afin de confirmer ces résultats, une expérience d'immunohistochimie avec un anticorps primaire contre IGF-I a été effectuée sur des sections de souris  $RAR\gamma^{-/-}$  et WT (figure 3-8). Au niveau de la prostate d'abord, on remarque un niveau d'expression de IGF-I plus faible chez les mutants  $RAR\gamma^{-/-}$  comparé au WT. Cette diminution est plus marquée chez les souris mutantes âgées de trois et six semaines (figure 3-8F, H). On remarque une forte expression de IGF-I dans le noyau de l'épithélium des souris WT correspondantes (figure 3-8B, D). Pour les vésicules séminales, on observe un patron d'expression de IGF-I très semblable à celui de la prostate. Chez les souris âgées de deux semaines, il y a très peu de différence d'expression de IGF-I entre le mutant et le WT (figure 3-8I, M). Toutefois, il y a une forte diminution de IGF-I dans l'épithélium des souris  $RAR\gamma^{-/-}$  âgées de trois semaines comparé au WT (figure 3-8J, N). À ce qui attrait à l'expression d'IGF-I chez les souris  $RAR\gamma^{-/-}$  âgées de quatre et six semaines (figure 3-8 K-L, O-P), la différence peut être due au changement de type cellulaire (métaplasie).

**Figure 3-8. Expression de IGF-I dans la prostate et les vésicules séminales des souris *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>* et WT.**

Immunohistochimie de sections prostate (A-H) et de vésicules séminales (I-P) de souris WT (A-D, I-L) et *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>* (E-H, M-P) avec un anticorps primaire anti-IGF-I. Au niveau de la prostate, on remarque qu'il y a une plus faible expression de IGF-I chez les souris nulles âgées de deux, trois et six semaines (E, F, H) comparativement à la souris WT correspondante (A, B, D). Par contre, le niveau d'expression d'IGF-I semble identique entre la prostate de souris *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>* et WT âgées de quatre semaines. Au niveau des vésicules séminales, on observe très peu de différence d'expression de IGF-I entre les souris mutantes et WT âgées de deux semaines (I, M). Toutefois, il y a une diminution d'expression chez les souris *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>* âgées de trois semaines (N) comparativement à la souris WT du même âge (J). Puisque le type cellulaire n'est plus le même dans les vésicules séminales des souris mutantes âgées de quatre et six semaines (O, P), la différence d'expression ne peut être comparée aux WT correspondants (K, L).





En conclusion, l'absence de RAR $\gamma$  dans la prostate et les vésicules séminales semble entraîner une diminution de l'expression d'IGF-I dans l'épithélium de ces glandes comparativement au WT, autant au niveau de l'ARNm que de la protéine.

## Chapitre 4

### ***Discussion***

#### **4.1 Le phénotype métaplasique débute chez les souris $RAR\gamma^{-/-}$ âgées entre deux et trois semaines**

La prostate et les vésicules séminales de souris expriment les  $RAR\alpha$  et  $RAR\gamma$ . Les souris  $RAR\alpha^{-/-}$  (Lufkin *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993) ne démontrent aucune anomalies au niveau de ces glandes, contrairement aux souris  $RAR\gamma^{-/-}$  (Lohnes *et al.*, 1993). Ces faits sont également appuyés par la découverte que les transcrits  $RAR\gamma$  sont de loin plus abondants que ceux de  $RAR\alpha$  (Lohnes *et al.*, 1993). La métaplasie squameuse observée dans la prostate et les vésicules séminales des mutants  $RAR\gamma^{-/-}$  ressemblent à celles observées dans certains épithélium des souris VAD (Wolbach *et al.*, 1925) (épithélium du tractus respiratoire, alimentaire, uro-génital et des yeux et les glandes reliées). Par contre, les autres épithéliums des souris  $RAR\gamma^{-/-}$  sont parfaitement normaux, suggérant une compensation par les autres RARs dans les tissus intacts.

Le but général de ce mémoire était d'identifier les molécules et/ou les voies de signalisation responsables de la métaplasie squameuse observée chez les souris  $RAR\gamma^{-/-}$ . Avant de débiter toutes expériences, il fallait déterminer l'âge des souris à analyser. Des sections de vésicules séminales de souris  $RAR\gamma^{-/-}$  âgées de deux à six semaines ont été examinées. Nous étions intéressés aux souris mutantes ne présentant pas encore de phénotype métaplasique, mais étant très près de ce dernier. Les souris  $RAR\gamma^{-/-}$  âgées entre deux et trois semaines correspondent au stade recherché puisque dès trois semaines, nous observons un début de désorganisation de l'épithélium simple cylindrique comparativement à la souris WT du même âge. À ce stade, les événements moléculaires conduisant au phénotype métaplasique sont amorcés et les différences dans l'expression moléculaire pouvant être observées ne sont pas encore dues à l'apparition d'un nouveau type cellulaire.

L'équipe du Dr Chambon a déjà décrit le phénotype de la prostate et des vésicules séminales des souris  $RAR\gamma^{-/-}$  (Lohnes *et al.*, 1993). Le but de cette expérience était de déterminer quand exactement le phénotype métaplasique débutait, ce qui a lieu dans les vésicules séminales des souris mutantes âgées entre deux et trois semaines. Les vésicules séminales possèdent un développement et une organisation très semblable à la prostate. De plus, le phénotype métaplasique observé au niveau de la prostate (Lohnes *et al.*, 1993) est identique à celui que nous avons observé lors de notre expérience, mais il apparaît plus tard (Lohnes *et al.*, 1993). Nous avons donc décidé d'effectuer nos expériences sur des vésicules séminales, puisque le stade recherché

est atteint plus tôt dans cet organe et que nos résultats pourront facilement être appliqués à la prostate.

#### **4.2 Diminution de l'expression de la $\beta$ -caténine dans la prostate des souris $RAR\gamma^-$**

La  $\beta$ -caténine est une composante centrale de la voie canonique des Wnt impliquée dans les processus développementaux durant l'embryogenèse et dans le maintien de l'homéostasie chez l'adulte (Logan *et al.*, 2004). En plus d'inter-relier la E-cadhérine avec l' $\alpha$ -caténine et le cytosquelette d'actine, la  $\beta$ -caténine et la voie des Wnt constituent des promoteurs potentiels de l'oncogenèse. En effet, des mutations de gain de fonction dans la  $\beta$ -caténine qui amène une  $\beta$ -caténine stabilisée, i.e. non-dégradable, sont bien caractérisées dans les cas du cancer du colon, du foie, de l'ovaire et de l'endomètre (Polakis, 2000). De plus, la  $\beta$ -caténine a été retrouvée mutée dans environ 5% des cas de cancer de la prostate (Voeller *et al.*, 1998), menant à une  $\beta$ -caténine constitutivement active.

Le rôle de la  $\beta$ -caténine stabilisée a été investigué par la production de souris transgéniques exprimant une  $\beta$ -caténine dont l'exon 3 a été supprimé (Gounari *et al.*, 2002; Bierie *et al.*, 2003), empêchant ainsi sa phosphorylation et sa dégradation. L'expression de la  $\beta$ -caténine stabilisée est sous le contrôle du promoteur MMTV-LTR qui permet de cibler son expression à plusieurs types cellulaires, dont la prostate et les vésicules séminales. Ces souris transgéniques ont développé des métaplasies squameuses de l'épithélium prostatique (Bierie *et al.*, 2003). Dans une autre étude, ces mêmes souris transgéniques ont développé des lésions néoplastiques dans l'épithélium de la prostate (Gounari *et al.*, 2002) et une transdifférentiation squameuse de l'épithélium des autres tissus.

Les métaplasies squameuses obtenues dans ces deux études ressemblent grandement à celles observées dans la prostate et les vésicules séminales des souris  $RAR\gamma^-$ . L'analyse de l'expression de la  $\beta$ -caténine dans la prostate et les vésicules séminales de nos mutants comparativement aux souris WT a montré que le niveau de  $\beta$ -caténine est plus élevé chez les souris âgées de deux semaines, juste avant le début de la transdifférentiation, mais que dès trois semaines où il y a l'apparition d'une désorganisation de l'épithélium, le niveau de  $\beta$ -caténine diminue. Selon la littérature et

nos résultats, l'augmentation du niveau de  $\beta$ -caténine semble être l'élément déclencheur responsable de la métaplasie. Nous avons ensuite cherché à confirmer cette hypothèse en gavant des souris WT à l'AR.

Il est connu de la littérature que l'AR possède un effet répressif sur l'activation transcriptionnelle par les facteurs LEF/TCF (Easwaran *et al.*, 1999). Les RARs ligandés empêcheraient la formation du complexe  $\beta$ -caténine-LEF/TCF en compétitionnant avec le facteur TCF afin de lier la  $\beta$ -caténine. Toutefois, aucune de ces études n'a rapporté un effet de l'AR sur le pool cytoplasmique ou nucléaire de la  $\beta$ -caténine. Néanmoins, si l'absence de RAR $\gamma$  est responsable de l'augmentation de l'expression de la  $\beta$ -caténine, nous devrions observer une diminution de l'expression de cette molécule après un traitement de souris WT à l'AR. Nous avons donc gavé des souris WT à l'AR et observé son effet sur la prostate et les vésicules séminales.

Comme nos prévisions, l'AR possède un effet répressif sur l'expression de la  $\beta$ -caténine dans ces deux glandes, déterminé par immunohistochimie. L'AR semble donc avoir une influence sur le niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine, ce qui vient appuyer les résultats précédents selon lesquels l'absence de RAR $\gamma$  augmenterait l'expression de la  $\beta$ -caténine dans la prostate et les vésicules séminales de souris âgées de deux semaines, ce qui pourrait être un des événements déclencheurs de la métaplasie. La diminution de l'expression de la  $\beta$ -caténine observée chez les souris mutantes âgées de trois semaines n'est probablement pas due à l'absence de RAR $\gamma$ , mais plutôt à la transdifférentiation qui débute, nécessitant la reprogrammation des cellules pour se différencier en un autre type cellulaire. La littérature citée ci-dessus n'observe aucun changement dans le pool cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine en réponse à l'AR. Par contre, ces études ont été effectuées dans des modèles cellulaires ne provenant pas de prostate. L'inhibition de l'expression de la  $\beta$ -caténine par l'AR pourrait être spécifique à certains types cellulaires comme les cellules épithéliales de prostate et de vésicules séminales.

Nous avons tenté de confirmer ces résultats par Western Blot, mais le ratio des cellules épithéliales par rapport aux cellules stromales étant faible, nous n'avons obtenu aucun résultat concluant puisque l'influence de l'AR sur la  $\beta$ -caténine ne semble avoir lieu que dans l'épithélium. L'analyse des vésicules séminales de souris RARE-reporter (Rossant *et al.*, 1991) supporte cette observation. La  $\beta$ -galactosidase étant sous le contrôle d'un promoteur contenant un RARE, la détection de son activité

correspond au lieu où on retrouve de l'AR et des RARs. Les cellules de l'épithélium des vésicules séminales de ces souris rapportrices possèdent ces deux éléments, contrairement au stroma. Ce dernier résultat suggère que l'effet de l'absence de RAR $\gamma$  ou du traitement à l'AR est de type cellule autonome ; ce ne sont pas les cellules du stroma qui sont affectées et qui transmettent le signal à l'épithélium.

Ces expériences démontrent que le niveau de  $\beta$ -caténine est plus élevé dans l'épithélium de prostate et de vésicules séminales chez les souris RAR $\gamma^{-/-}$  avant la transdifférentiation et que l'absence de RAR $\gamma$  dans l'épithélium pourrait être responsable de ce changement puisque l'AR ne peut plus exercer son effet répressif sur la  $\beta$ -caténine, démontré par le gavage des souris WT à l'AR.

### **4.3 Faible activité de la voie canonique des Wnt dans la prostate**

La  $\beta$ -caténine étant la composante centrale de la voie canonique des Wnt, nous nous sommes demandé si l'influence de l'AR sur la  $\beta$ -caténine dans la prostate et les vésicules séminales passe par la voie canonique des Wnt ou encore, par une autre voie. Comme mentionné précédemment, l'AR possède un effet répressif sur l'activation transcriptionnelle par les facteurs LEF/TCF (Easwaran *et al.*, 1999), sans affecter le pool de  $\beta$ -caténine du cytoplasme et du noyau (Shah *et al.*, 2003). Toutefois, ces études ont été effectuées dans des modèles cellulaires ne provenant pas de la prostate. Il n'est donc pas exclu que l'AR diminue le pool de  $\beta$ -caténine de l'épithélium de la prostate en passant par la voie canonique des Wnt.

Les Wnt ne sont pas considérés comme étant des molécules importantes pour le développement de la prostate. Très peu de Wnt y ont d'ailleurs été retrouvés. Wnt7B est exprimé très faiblement dans la prostate humaine d'adulte (Kirikoshi *et al.*, 2001) contrairement à Wnt5B (Saitoh *et al.*, 2001) et Wnt13 (Katoh *et al.*, 1996) qui sont plus abondants. Il est à noter que ce ne sont pas tous les Wnt qui activent la voie canonique des Wnt. Par exemple, Wnt3A et Wnt5A peuvent lier Fz-1, mais seulement Wnt3A est capable d'activer la transcription par les facteurs LEF/TCF (Polakis, 2000). Le rôle des Wnt dans la prostate est toutefois associé à la carcinogenèse. Wnt2 (Katoh, 2001) et Wnt5A (Dupé *et al.*, 2003) sont quelques fois surexprimés dans le cancer de la prostate. Néanmoins, le rôle de la voie canonique des Wnt dans l'oncogenèse est plutôt associé à la surexpression de la  $\beta$ -caténine causée par une

mutation de cette dernière ou encore par l'inactivation des molécules responsable de sa dégradation, comme l'APC (Polakis, 2000).

Afin d'évaluer l'activité de la voie canonique des Wnt dans la prostate et les vésicules séminales, nous avons utilisé des souris transgéniques *Wnt-reporter* exprimant la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur contenant la région liant les facteurs de transcription LEF/TCF (Fan *et al.*, 2003). Suite à une coloration au X-Gal, aucune activité de la voie canonique n'a été détectée dans la prostate ni dans les vésicules séminales. Le contrôle positif consistant à la coloration des follicules pileux d'une section d'oreille de la même souris analysée a bien coloré, indiquant que la technique a fonctionné. L'absence ou la très faible activité de la voie canonique des Wnt dans la prostate suggère que l'AR influence la  $\beta$ -caténine via des molécules n'étant pas impliquées dans la transcription par les facteurs LEF/TCF. Les récepteurs aux androgènes pourrait être une cible potentielle.

#### **4.4 Influence de l'AR sur la $\beta$ -caténine complexée aux récepteurs aux androgènes**

Comme mentionné précédemment, les androgènes sont essentiels pour la spécification et la morphogenèse de façon adéquate de la prostate et des vésicules séminales. La castration, privant l'organisme de la principale source d'androgènes, empêche le développement des ces deux glandes (Jost A., 1953). Les récepteurs aux androgènes, qui sont des facteurs de transcription membres de la famille des récepteurs stéroïdiens, permettent la transcription des gènes cibles suite à la liaison de leur ligand, la DHT.

Très peu études font part de l'influence de l'AR sur les récepteurs aux androgènes. Zhao *et al.* ont montré que l'expression des récepteurs aux androgènes est augmentée suite au traitement des cellules avec de l'AR 9-*cis* (Zhao *et al.*, 1999). En effet, nos résultats d'essai luciférase et de coimmunoprécipitation suggèrent que l'AR stimule l'expression des récepteurs aux androgènes. Toutefois, nos mesures de l'induction relative de l'activité des récepteurs aux androgènes indique que l'AR inhiberait leur activité (figure 3-6B). Nous espérons ces résultats puisque la littérature fait part d'une augmentation de l'activité des récepteurs aux androgènes par leur interaction avec la  $\beta$ -caténine et que l'AR diminue l'expression de la  $\beta$ -caténine selon notre expérience d'immunohistochimie sur des souris gavées à l'AR (figure 3-3).



Comme mentionné précédemment, les RARs ligandés inhiberaient l'activité de la  $\beta$ -caténine en séquestrant le coactivateur CBP/p300 (Shah *et al.*, 2003) ou encore en compétitionnant avec le facteur TCF afin de lier la  $\beta$ -caténine (Easwaran *et al.*, 1999). L'équipe du Dr Byers a également démontré que les RARs ligandés pouvaient séquestrer le coactivateur CBP/p300, inhibant ainsi l'activité de la  $\beta$ -caténine (Shah *et al.*, 2003). L'activité HAT du coactivateur CBP/p300 étant également nécessaire dans l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires, il n'est pas exclu que les RARs ligandés réprime l'activité des récepteurs aux androgènes par la séquestration de CBP/p300. L'AR semble donc augmenter l'expression des récepteurs aux androgènes, mais inhiber leur activité. Cet effet peut sembler à première vue contradictoire, mais une grande quantité de récepteurs aux androgènes dans une même cellule pourrait avoir un effet inhibiteur sur leur propre activité par compétition pour le ligand ou encore par un encombrement mutuel. L'AR pourrait en fait inhiber l'activité des récepteurs aux androgènes en séquestrant des molécules importantes dans leur activation comme CBP/p300 et la  $\beta$ -caténine, et en augmentant leur nombre afin qu'ils se nuisent entre eux.

Comme mentionné précédemment, les RARs ligandés inhiberaient l'activité de la  $\beta$ -caténine en séquestrant le coactivateur CBP/p300 (Shah *et al.*, 2003). Cette interaction entre les RARs et CBP/p300 peut également inhiber l'activité des récepteurs aux androgènes puisque ce coactivateur est également nécessaire dans l'activation androgénique. Nous nous sommes intéressés à l'influence de l'AR sur la  $\beta$ -caténine complexée aux récepteurs aux androgènes. En effet, la  $\beta$ -caténine augmente l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante des récepteurs aux androgènes (Truica *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002; Chesire *et al.*, 2002a) par une interaction directe entre ces deux protéines. Cette interaction a été découverte par des expériences de double hybrides montrant également que les récepteurs aux androgènes entraîneraient la  $\beta$ -caténine au noyau (Yang *et al.*, 2002; Mulholland *et al.*, 2002). La  $\beta$ -caténine interagirait plus précisément avec le domaine de transactivation 2 (AF2) des récepteurs aux androgènes (Song *et al.*, 2003).

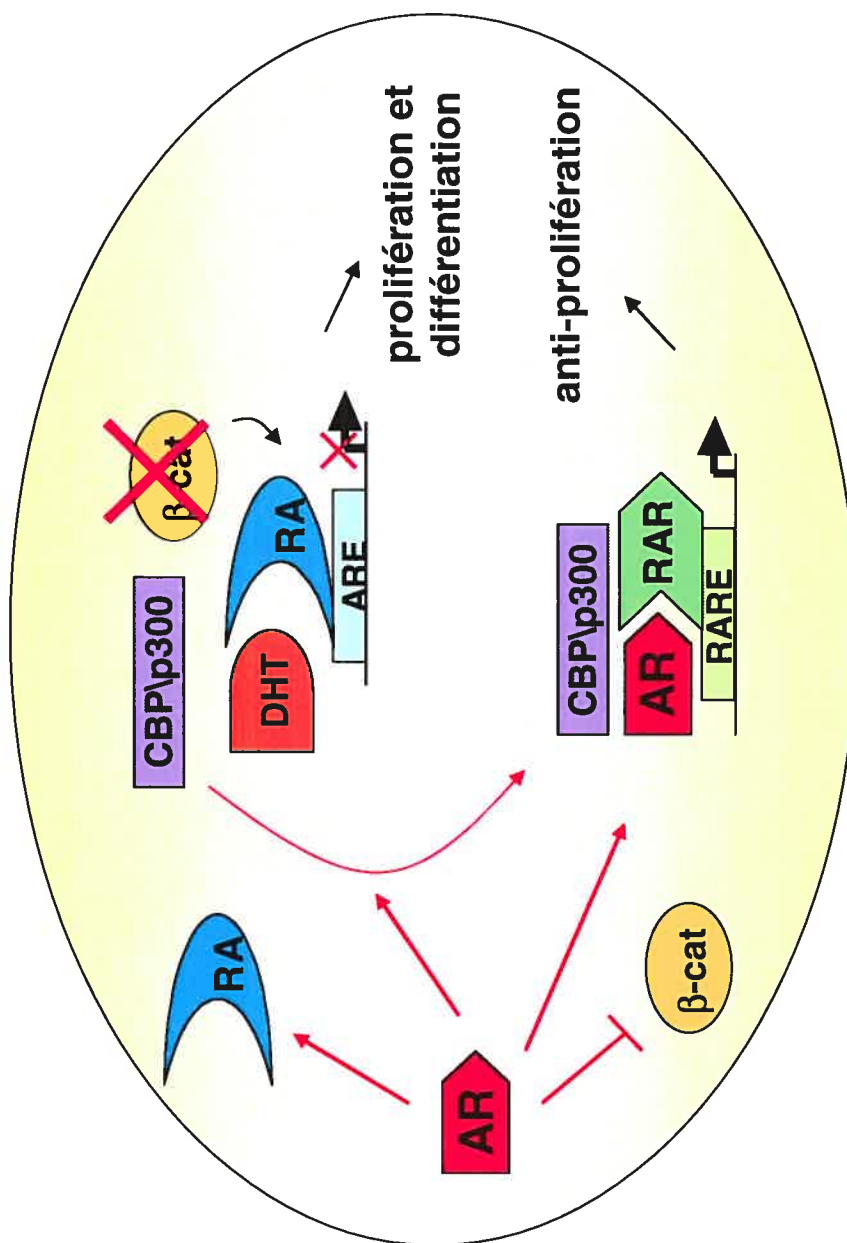
Selon la littérature et nos résultats, l'AR influencerait la  $\beta$ -caténine et les récepteurs aux androgènes de façon indépendante n'impliquant pas la voie canonique des Wnt. Sachant que les récepteurs aux androgènes interagissent directement avec la  $\beta$ -caténine, nous nous sommes donc intéressés à l'influence de l'AR sur la  $\beta$ -

caténine complexé aux récepteurs aux androgènes. Par une expérience de coimmunoprécipitation utilisant un anticorps contre les récepteurs aux androgènes, nous avons pu observer une faible augmentation de la  $\beta$ -caténine complexée aux récepteurs aux androgènes suivant le traitement à l'AR, mais également une forte augmentation de l'expression des récepteurs aux androgènes. Par comparaison de l'intensité des bandes avec ImageQuant, on remarque une plus forte augmentation de l'expression des récepteurs aux androgènes comparativement à l'augmentation de la  $\beta$ -caténine du complexe, suggérant que l'effet de l'AR affecte indépendamment les deux composantes du complexe. L'AR semble donc augmenter l'expression des récepteurs aux androgènes sans toutefois affecter le complexe  $\beta$ -caténine/récepteurs aux androgènes.

Ces derniers résultats n'ont été répétés qu'une fois et sont donc préliminaires. Selon nos premiers résultats montrant une diminution de l'expression de la  $\beta$ -caténine dans la prostate de souris gavées à l'AR, nous aurions pu nous attendre à une diminution dans la formation du complexe  $\beta$ -caténine/récepteurs aux androgènes dans les LNCaP par manque de  $\beta$ -caténine. Les modèles cellulaires ne reflétant pas toujours l'être vivant puisqu'elles sont transformées, d'autres études s'imposent, comme la confirmation de nos résultats dans la prostate de souris gavées à l'AR.

Finalement, nos résultats proposent que l'AR diminue l'expression de la  $\beta$ -caténine et augmente l'expression des récepteurs aux androgènes, sans toutefois avoir un effet notoire sur le complexe  $\beta$ -caténine/récepteurs aux androgènes dans des cellules de prostate humaine. Tous nos résultats semblent converger vers un même point; l'AR inhibe l'activation des récepteurs aux androgènes (figure 4-1). La diminution de l'expression de la  $\beta$ -caténine empêche l'activation des récepteurs aux androgènes via leur interaction avec la  $\beta$ -caténine et la forte augmentation de l'expression des récepteurs aux androgènes peut mener à leur inhibition mutuelle par une compétition pour leur ligand et/ou par un encombrement entre eux afin de lier leur promoteur. De plus, les RARs ligandés séquestrent le facteur de transcription CBP/p300, le rendant non-disponible pour les récepteurs aux androgènes, ce qui a pour effet d'inhiber leur activité (figure 4-1).

L'AR semble en tout point avoir un effet anti-prolifératif par l'inhibition de l'expression de la  $\beta$ -caténine et de l'activité des récepteurs aux androgènes, ce qui semble appuyer l'utilisation des rétinoïdes dans le traitement du cancer de la prostate.



**Figure 4-1. Modèle de régulation par l'acide rétinoïque.**

AR, acide rétinoïque; ARE, élément de réponse aux récepteurs aux androgènes; β-cat, β-caténine; DHT, dihydrotestostérone; RA, récepteurs aux androgènes; RAR, récepteurs à l'acide rétinoïque; RARE, élément de réponse à l'acide rétinoïque.

Les flèches et les croix rouges correspondent à l'effet de l'AR.  
Voir texte pour les détails.

Une meilleure caractérisation des mécanismes impliqués dans ces différents phénomènes pourrait permettre de découvrir de nouvelles voies thérapeutiques dans le cancer de la prostate.

#### **4.5 Diminution de l'expression de IGF-I chez les souris $RAR\gamma^{-/-}$**

Les IGFs jouent un rôle primordial dans la régulation de la croissance et dans la résistance à l'apoptose (Cleutjens *et al.*, 1996). Les IGFs sont de plus, d'importants facteurs mitogéniques de la prostate et sont essentiels pour son développement et sa croissance (Ruan *et al.*, 1999). Les mutants  $IGF-1^{-/-}$  démontrant une prostate plus petite comme les mutants  $RAR\gamma^{-/-}$ , nous nous sommes intéressés à l'expression du facteur IGF-I dans la prostate de nos mutants par rapport aux souris WT afin de déterminer si ce facteur de croissance pouvait également être impliqué dans la métaplasie observée.

Des publications récentes en lien avec nos études précédentes ont également attiré notre attention sur le facteur IGF-I. Il est connu que les facteurs IGFs augmentent la motilité via les intégrines et diminuent ainsi l'adhésion cellulaire (Leventhal *et al.*, 1997). Il a été découvert que le facteur IGF-I amènerait la destruction des E-cadhérines en causant la phosphorylation des résidus tyrosines de la  $\beta$ -caténine, ce qui libérerait la  $\beta$ -caténine et augmenterait son pool cellulaire (Playford *et al.*, 2000). Selon cette même étude, IGF-I augmenterait également la stabilité de la  $\beta$ -caténine. D'autres recherches ont montré que IGF-I est le facteur de croissance le plus efficace afin d'activer les récepteurs aux androgènes en absence de ligand (Chithalen *et al.*, 2002).

Comme mentionné précédemment, différentes études ont montré une interaction protéine-protéine spécifique entre la  $\beta$ -caténine et les récepteurs aux androgènes (Truica *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002; Mulholland *et al.*, 2002). De façon intéressante, une étude récente a montré que la  $\beta$ -caténine serait impliquée dans l'induction de la transcription des récepteurs aux androgènes par le facteur IGF-I (Verras *et al.*, 2004).

L'analyse de l'expression du facteur IGF-I dans la prostate et les vésicules séminales des souris  $RAR\gamma^{-/-}$  a montré que l'absence de ce récepteur entraîne une diminution de l'expression de IGF-I chez les souris âgées de trois à six semaines. Selon la littérature citée ci-dessus, ce dernier résultat semble aller dans le même sens que la diminution de l'expression de la  $\beta$ -caténine observée dans la prostate de nos

mutants. L'absence de RAR $\gamma$  semble diminuer l'expression de IGF-I, causant la diminution de la motilité et l'augmentation de l'adhésion cellulaire en augmentant la formation des jonctions cellulaires et le recrutement de la  $\beta$ -caténine pour la formation de ces dernières, ce qui cause une diminution du pool de  $\beta$ -caténine. Par contre, la diminution de l'expression du facteur IGF-I ne semble pas être à l'origine de la transdifférentiation, car chez les souris âgées de deux semaines ne montrant aucune désorganisation de l'épithélium, le niveau d'IGF-I est très semblable chez la souris RAR $\gamma^{-/-}$  et WT.

L'élévation de l'expression de la  $\beta$ -caténine dans la prostate et les vésicules séminales des souris âgées de deux semaines semble toujours être l'événement déclencheur de la métaplasie et la diminution de l'expression d'IGF-I ne semble qu'être un événement contribuant à la progression de cette métaplasie.

Puisque l'AR influence la  $\beta$ -caténine, les récepteurs aux androgènes et le facteur IGF-I et qu'il a été montré que la  $\beta$ -caténine serait impliqué dans l'induction de la transcription des récepteurs aux androgènes par le facteur IGF-I (Verras *et al.*, 2004), il serait très pertinent d'étendre nos études à mieux comprendre les liens entre ces molécules et ainsi que leur régulation.

#### **4.6 Perspectives futures**

Notre modèle suggère que l'AR inhibe l'expression de la  $\beta$ -caténine et augmente l'expression des récepteurs aux androgènes indépendamment du complexe formé de ces deux molécules qui n'augmente pas.

Le rôle de la  $\beta$ -caténine dans le cancer de la prostate reste encore nébuleux, malgré qu'une augmentation de son expression soit retrouvée dans 5-7 % des cas de cancer de la prostate (Voeller *et al.*, 1998). Il est connu que les RARs ligandés inhibent la voie canonique des Wnt par la compétition avec le facteur TCF pour lier la  $\beta$ -caténine ou encore par la séquestration du coactivateur CBP/p300 nécessaire dans l'activation de la transcription par les facteur LEF/TCF et la  $\beta$ -caténine. Toutefois ces équipes n'ont observé aucun changement dans le pool cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine. Dans la littérature, aucune étude ne fait part de l'observation d'une diminution de l'expression de la  $\beta$ -caténine suite au traitement à l'AR dans la prostate. Une investigation plus profonde serait nécessaire afin de confirmer ce résultat.

de l'épithélium du stroma par digestion enzymatique afin d'augmenter le ratio des cellules épithéliales par rapport aux cellules stromales serait possible. Une analyse par *Western Blot* ou *Northern Blot* serait ensuite envisageable afin de confirmer l'effet inhibiteur de l'AR sur l'expression de la  $\beta$ -caténine. Ensuite, il serait intéressant de caractériser le mécanisme impliqué dans cette inhibition. Des études pourraient être effectuées dans le but de savoir si les différentes molécules responsables de la dégradation de la  $\beta$ -caténine dans la voie canonique des Wnt comme la GSK3 $\beta$  sont impliquées. Par exemple, l'inhibition d'une des molécules à la fois combinée à un traitement à l'AR des LNCaP pourrait nous éclaircir sur cet aspect du mécanisme. Une meilleure caractérisation du mécanisme responsable de l'inhibition de la  $\beta$ -caténine par l'AR pourrait ouvrir de nouvelles portes sur des molécules à cibler lors du traitement du cancer de la prostate.

Nos études montrent également une influence de l'AR sur l'expression du facteur de croissance IGF-I par l'analyse des souris *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>*. Selon la littérature, il semblerait que le facteur IGF-I libère la  $\beta$ -caténine des jonctions cellulaires (Playford *et al.*, 2000) et augmente également la stabilité de la  $\beta$ -caténine. IGF-I serait de plus le facteur de croissance le plus efficace afin d'activer les récepteurs aux androgènes en absence de ligand (Chithalen *et al.*, 2002). Une étude récente a montré que la  $\beta$ -caténine serait impliqué dans l'induction de la transcription des récepteurs aux androgènes par le facteur IGF-I (Verras *et al.*, 2004). En lien avec nos études, il serait d'abord pertinent d'analyser l'expression de IGF-I dans la prostate de souris gavées à l'AR. De plus, il serait intéressant de vérifier si l'influence de l'AR sur le facteur IGF-I a un impact direct sur les récepteurs aux androgènes et la  $\beta$ -caténine par des expériences de transfection, par exemple.

Le but de ce mémoire était d'identifier des molécules et des voies de signalisation impliquées dans la métaplasie observée dans la prostate et les vésicules séminales des souris *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>*. La  $\beta$ -caténine semble être impliquée. Toutefois, il serait intéressant d'effectuer une expérience à grande échelle dans le but d'identifier plusieurs gènes candidats. La méthode du *microarray* semble être une expérience appropriée. En comparant l'expression d'une multitude de gènes provenant d'échantillons de prostate de souris WT et *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>*, il serait possible d'identifier des voies de signalisation faisant défaut et ainsi identifier de nouvelles voies de signalisation régulées par l'AR. De plus, cette méthode pourrait confirmer la surexpression de la  $\beta$ -caténine et la sous-

expression du facteur IGF-I dans la prostate des souris mutantes dont fait part ce mémoire.

#### **4.7 Conclusion**

La prostate et les vésicules séminales des souris *RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup>* montrent une métaplasie squameuse de la prostate et des vésicules séminales. Nos études ont montré que l'absence de RAR $\gamma$  semble augmenter l'expression de la  $\beta$ -caténine avant le début de la transdifférentiation et diminuer l'expression du facteur de croissance IGF-I. De plus, l'AR semble diminuer l'expression de la  $\beta$ -caténine et augmenter l'expression des récepteurs aux androgènes sans affecter le complexe formé de ces deux molécules dans des cellules de prostate humaine, par un mécanisme encore inconnu. Tous nos résultats semblent converger vers un même rôle de l'AR, celui d'inhiber l'activité des récepteurs aux androgènes. Ces études ont permis d'établir un nouveau rôle de l'AR dans le développement de la prostate. La  $\beta$ -caténine, IGF-I et les récepteurs aux androgènes étant impliqués directement ou indirectement dans le cancer de la prostate, une meilleure caractérisation des *cross-talks* entre les voies impliquant ces molécules pourrait permettre la découverte de nouvelles voies thérapeutiques.

## RÉFÉRENCES

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16**: 3797-3804.
- Abrahamsson, P.A. (1996). Neuroendocrine differentiation and hormone-refractory prostate cancer. *Prostate Suppl* **6**: 3-8.
- Abu-Abed, S., Dollé, P., Metzger, D., Wood, C., MacLean, G., Chambon, P., Petkovich, M. (2003). Developing with lethal RA levels: genetic ablation of Rarg can restore the viability of mice lacking Cyp26a1. *Development* **130**: 1449-1459.
- Alles, A.J., Sulik, K.K. (1992). Pathogenesis of retinoid-induced hindbrain malformations in an experimental model. *Clin. Dysmorphol.* **1**: 187-200.
- Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J.S., Ben Shushan, E., Mann, M., Ben Neriah, Y., Alkalay, I. (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* **16**: 1066-1076.
- Aranda, A., Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* **81**: 1269-1304.
- Attar, P.S., Wertz, P.W., McArthur, M., Imakado, S., Bickenbach, J.R., Roop, D.R. (1997). Inhibition of retinoid signaling in transgenic mice alters lipid processing and disrupts epidermal barrier function. *Mol. Endocrinol.* **11**: 792-800.
- Barker, N., Hurlstone, A., Musisi, H., Miles, A., Bienz, M., Clevers, H. (2001). The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J.* **20**: 4935-4943.
- Bastien, J., Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* **328**: 1-16.
- Bedwal, R.S., Bahuguna, A. (1994). Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia* **50**: 626-640.
- Berry, S.J., Isaacs, J.T. (1984). Comparative aspects of prostatic growth and androgen metabolism with aging in the dog versus the rat. *Endocrinology* **114**: 511-520.
- Bierie, B., Nozawa, M., Renou, J.P., Shillingford, J.M., Morgan, F., Oka, T., Taketo, M.M., Cardiff, R.D., Miyoshi, K., Wagner, K.U., Robinson, G.W., Hennighausen, L. (2003). Activation of beta-catenin in prostate epithelium induces hyperplasias and squamous transdifferentiation. *Oncogene* **22**: 3875-3887.



Blanco, J.C., Minucci, S., Lu, J., Yang, X.J., Walker, K.K., Chen, H., Evans, R.M., Nakatani, Y., Ozato, K. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev.* **12**: 1638-1651.

Blutt, S.E., Allegretto, E.A., Pike, J.W., Weigel, N.L. (1997). 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 9-cis-retinoic acid act synergistically to inhibit the growth of LNCaP prostate cells and cause accumulation of cells in G1. *Endocrinology* **138**: 1491-1497.

Bollag, W. (1996). The retinoid revolution. Overview. *FASEB J.* **10**: 938-939.

Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- $\alpha$ . *Nature* **375**: 377-382.

Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R.T., Kimelman, D. (1997). A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev.* **11**: 2359-2370.

Bruckheimer, E.M., Kyprianou, N. (2000). Apoptosis in prostate carcinogenesis. A growth regulator and a therapeutic target. *Cell Tissue Res.* **301**: 153-162.

Butler, W.B., Fontana, J.A. (1992). Responses to retinoic acid of tamoxifen-sensitive and -resistant sublines of human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res.* **52**: 6164-6167.

Byers, S., Pishvaian, M., Crockett, C., Peer, C., Tozeren, A., Sporn, M., Anzano, M., Lechleider, R. (1996). Retinoids increase cell-cell adhesion strength, beta-catenin protein stability, and localization to the cell membrane in a breast cancer cell line: a role for serine kinase activity. *Endocrinology* **137**: 3265-3273.

Campbell, M.J., Park, S., Uskokovic, M.R., Dawson, M.I., Koeffler, H.P. (1998). Expression of retinoic acid receptor-beta sensitizes prostate cancer cells to growth inhibition mediated by combinations of retinoids and a 19-nor hexafluoride vitamin D3 analog. *Endocrinology* **139**: 1972-1980.

Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M., Bejsovec, A. (1998). *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* **395**: 604-608.

Chakravarti, D., LaMorte, V.J., Nelson, M.C., Nakajima, T., Schulman, I.G., Juguilon, H., Montminy, M., Evans, R.M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* **383**: 99-103.

Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**: 940-954.

Chan, J.M., Stampfer, M.J., Giovannucci, E., Gann, P.H., Ma, J., Wilkinson, P., Hennekens, C.H., Pollak, M. (1998). Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* **279**: 563-566.

Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W., Stallcup, M.R. (1999a). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* **284**: 2174-2177.

Chen, H., Lin, R.J., Xie, W., Wilpitz, D., Evans, R.M. (1999b). Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* **98**: 675-686.

Chen, J.D., Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**: 454-457.

Chen, W., ten Berge, D., Brown, J., Ahn, S., Hu, L.A., Miller, W.E., Caron, M.G., Barak, L.S., Nusse, R., Lefkowitz, R.J. (2003). Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* **301**: 1391-1394.

Chesire, D.R., Ewing, C.M., Gage, W.R., Isaacs, W.B. (2002a). In vitro evidence for complex modes of nuclear beta-catenin signaling during prostate growth and tumorigenesis. *Oncogene* **21**: 2679-2694.

Chesire, D.R., Isaacs, W.B. (2002b). Ligand-dependent inhibition of beta-catenin/TCF signaling by androgen receptor. *Oncogene* **21**: 8453-8469.

Chithalen, J.V., Luu, L., Petkovich, M., Jones, G. (2002). HPLC-MS/MS analysis of the products generated from all-trans-retinoic acid using recombinant human CYP26A. *J. Lipid Res.* **43**: 1133-1142.

Chopra, D.P., Wilkoff, L.J. (1976). Inhibition and reversal by beta-retinoic acid of hyperplasia induced in cultured mouse prostate tissue by 3-methylcholanthrene or N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Natl. Cancer Inst.* **56**: 583-589.

Cleutjens, K.B., van Eekelen, C.C., van der Korput, H.A., Brinkmann, A.O., Trapman, J. (1996). Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J. Biol. Chem.* **271**: 6379-6388.

Cooke, P.S., Young, P., Cunha, G.R. (1991). Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology* **128**: 2867-2873.

Cote, J., Quinn, J., Workman, J.L., Peterson, C.L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* **265**: 53-60.

Cunha, G.R., Battle, E., Young, P., Brody, J., Donjacour, A., Hayashi, N., Kinbara, H. (1992). Role of epithelial-mesenchymal interactions in the differentiation and spatial organization of visceral smooth muscle. *Epithelial Cell Biol.* **1**: 76-83.

Cunha, G.R., Chung, L.W., Shannon, J.M., Taguchi, O., Fujii, H. (1983). Hormone-induced morphogenesis and growth: role of mesenchymal-epithelial interactions. *Recent Prog. Horm. Res.* **39**: 559-598.

Cunha, G.R., Donjacour, A.A., Cooke, P.S., Mee, S., Bigsby, R.M., Higgins, S.J., Sugimura, Y. (1987). The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr. Rev.* **8**: 338-362.

Cunha, G.R., Lung, B. (1979). The importance of stroma in morphogenesis and functional activity of urogenital epithelium. *In Vitro* **15**: 50-71.

Damm, K., Thompson, C.C., Evans, R.M. (1989). Protein encoded by v-erbA functions as a thyroid-hormone receptor antagonist. *Nature* **339**: 593-597.

De Kretser, D.M., Catt, K.J., Paulsen, C.A. (1971). Studies on the in vitro testicular binding of iodinated luteinizing hormone in rats. *Endocrinology* **88**: 332-337.

de The, H., Vivanco-Ruiz, M.M., Tiollais, P., Stunnenberg, H., Dejean, A. (1990). Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature* **343**: 177-180.

Deltour, L., Foglio, M.H., Duester, G. (1999a). Impaired retinol utilization in Adh4 alcohol dehydrogenase mutant mice. *Dev. Genet.* **25**: 1-10.

Deltour, L., Foglio, M.H., Duester, G. (1999b). Metabolic deficiencies in alcohol dehydrogenase Adh1, Adh3, and Adh4 null mutant mice. Overlapping roles of Adh1 and Adh4 in ethanol clearance and metabolism of retinol to retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **274**: 16796-16801.

Deltour, L., Haselbeck, R.J., Ang, H.L., Duester, G. (1997). Localization of class I and class IV alcohol dehydrogenases in mouse testis and epididymis: potential retinol dehydrogenases for endogenous retinoic acid synthesis. *Biol. Reprod.* **56**: 102-109.

Delva, L., Bastie, J.N., Rochette-Egly, C., Kraiba, R., Balitrand, N., Despouy, G., Chambon, P., Chomienne, C. (1999). Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol. Cell Biol.* **19**: 7158-7167.

DiPaola, R.S., Aisner, J. (1999). Overcoming bcl-2- and p53-mediated resistance in prostate cancer. *Semin. Oncol.* **26**: 112-116.

Dollé, P., Fraulob, V., Kastner, P., Chambon, P. (1994). Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. *Mech. Dev.* **45**: 91-104.

Dollé, P., Ruberte, E., Kastner, P., Petkovich, M., Stoner, C.M., Gudas, L.J., Chambon, P. (1989). Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse. *Nature* **342**: 702-705.

Dollé, P., Ruberte, E., Leroy, P., Morriss-Kay, G., Chambon, P. (1990). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* **110**: 1133-1151.

Donjacour, A.A., Rosales, A., Higgins, S.J., Cunha, G.R. (1990). Characterization of antibodies to androgen-dependent secretory proteins of the mouse dorsolateral prostate. *Endocrinology* **126**: 1343-1354.

Duester, G. (2000). Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* **267**: 4315-4324.

Dupé, V., Matt, N., Garnier, J.M., Chambon, P., Mark, M., Ghyselinck, N.B. (2003). A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**: 14036-14041.

Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R., Chambon, P. (1994). Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J.* **13**: 5370-5382.

E X, Zhang, L., Lu, J., Tso, P., Blaner, W.S., Levin, M.S., Li, E. (2002). Increased neonatal mortality in mice lacking cellular retinol-binding protein II. *J. Biol. Chem.* **277**: 36617-36623.

Easwaran, V., Pishvaian, M., Salimuddin, Byers, S. (1999). Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr. Biol.* **9**: 1415-1418.

Eckner, R., Ewen, M.E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J.A., Lawrence, J.B., Livingston, D.M. (1994). Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev.* **8**: 869-884.

Edwards, D.P. (2000). The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* **5**: 307-324.

Ekman, P. (1995). Endocrine therapy for benign prostatic hyperplasia in the 90's. *J. Urol. (Paris)* **101**: 22-25.

Emmert-Buck, M.R., Vocke, C.D., Pozzatti, R.O., Duray, P.H., Jennings, S.B., Florence, C.D., Zhuang, Z., Bostwick, D.G., Liotta, L.A., Linehan, W.M. (1995). Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res.* **55**: 2959-2962.

Evans, R.M., Hollenberg, S.M. (1988). Zinc fingers: guilt by association. *Cell* **52**: 1-3.

Fagotto, F., Funayama, N., Gluck, U., Gumbiner, B.M. (1996). Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in *Xenopus*. *J. Cell Biol.* **132**: 1105-1114.

Fan, X., Molotkov, A., Manabe, S., Donmoyer, C.M., Deltour, L., Foglio, M.H., Cuenca, A.E., Blaner, W.S., Lipton, S.A., Duester, G. (2003). Targeted disruption of *Aldh1a1* (*Raldh1*) provides evidence for a complex mechanism of retinoic acid synthesis in the developing retina. *Mol. Cell Biol.* **23**: 4637-4648.

Fiorella, P.D., Napoli, J.L. (1991). Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*. Characterization and evidence that holo-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism. *J. Biol. Chem.* **266**: 16572-16579.

Font, d.M., Brown, M. (2000). AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol. Cell Biol.* **20**: 5041-5047.

Forman, B.M., Yang, C.R., Au, M., Casanova, J., Ghysdael, J., Samuels, H.H. (1989). A domain containing leucine-zipper-like motifs mediate novel in vivo interactions between the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Mol. Endocrinol.* **3**: 1610-1626.

Ghyselinck, N.B., Bavik, C., Sapin, V., Mark, M., Bonnier, D., Hindelang, C., Dierich, A., Nilsson, C.B., Hakansson, H., Sauvant, P., Azais-Braesco, V., Frasson, M., Picaud, S., Chambon, P. (1999). Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J.* **18**: 4903-4914.

Goossens, K., Esquenet, M., Swinnen, J.V., Manin, M., Rombauts, W., Verhoeven, G. (1999). Androgens decrease and retinoids increase the expression of insulin-like growth factor-binding protein-3 in LNCaP prostatic adenocarcinoma cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **155**: 9-18.

Gorry, P., Lufkin, T., Dierich, A., Rochette-Egly, C., Decimo, D., Dollé, P., Mark, M., Durand, B., Chambon, P. (1994). The cellular retinoic acid binding protein I is dispensable. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**: 9032-9036.

Gottesman, M.E., Quadro, L., Blaner, W.S. (2001). Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* **23**: 409-419.

Gottlicher, M., Heck, S., Herrlich, P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J. Mol. Med.* **76**: 480-489.

Gounari, F., Signoretti, S., Bronson, R., Klein, L., Sellers, W.R., Kum, J., Siemann, A., Taketo, M.M., von Boehmer, H., Khazaie, K. (2002). Stabilization of beta-catenin induces lesions reminiscent of prostatic intraepithelial neoplasia, but terminal squamous transdifferentiation of other secretory epithelia. *Oncogene* **21**: 4099-4107.

Gu, W., Malik, S., Ito, M., Yuan, C.X., Fondell, J.D., Zhang, X., Martinez, E., Qin, J., Roeder, R.G. (1999). A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation. *Mol. Cell* **3**: 97-108.

Gustafson, A.L., Dencker, L., Eriksson, U. (1993). Non-overlapping expression of CRBP I and CRABP I during pattern formation of limbs and craniofacial structures in the early mouse embryo. *Development* **117**: 451-460.

Hall, M.C., Navone, N.M., Troncoso, P., Pollack, A., Zagars, G.K., von Eschenbach, A.C., Conti, C.J., Chung, L.W. (1995). Frequency and characterization of p53 mutations in clinically localized prostate cancer. *Urology* **45**: 470-475.

Hart, M.J., de los, S.R., Albert, I.N., Rubinfeld, B., Polakis, P. (1998). Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr. Biol.* **8**: 573-581.

Haselbeck, R.J., Ang, H.L., Deltour, L., Duester, G. (1997a). Retinoic acid and alcohol/retinol dehydrogenase in the mouse adrenal gland: a potential endocrine source of retinoic acid during development. *Endocrinology* **138**: 3035-3041.

Haselbeck, R.J., Ang, H.L., Duester, G. (1997b). Class IV alcohol/retinol dehydrogenase localization in epidermal basal layer: potential site of retinoic acid synthesis during skin development. *Dev. Dyn.* **208**: 447-453.

Haselbeck, R.J., Duester, G. (1997c). Regional restriction of alcohol/retinol dehydrogenases along the mouse gastrointestinal epithelium. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **21**: 1484-1490.

Hecht, A., Vleminckx, K., Stemmler, M.P., van Roy, F., Kemler, R. (2000). The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J.* **19**: 1839-1850.

Hedgepeth, C.M., Deardorff, M.A., Rankin, K., Klein, P.S. (1999). Regulation of glycogen synthase kinase 3beta and downstream Wnt signaling by axin. *Mol. Cell Biol.* **19**: 7147-7157.

Hoffmann, B., Lehmann, J.M., Zhang, X.K., Hermann, T., Husmann, M., Graupner, G., Pfahl, M. (1990). A retinoic acid receptor-specific element controls the retinoic acid receptor-beta promoter. *Mol. Endocrinol.* **4**: 1727-1736.

Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., . (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**: 397-404.

Hsieh, J.C., Kodjabachian, L., Rebbert, M.L., Rattner, A., Smallwood, P.M., Samos, C.H., Nusse, R., Dawid, I.B., Nathans, J. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* **398**: 431-436.

Huang, H.F., Li, M.T., Von Hagen, S., Zhang, Y.F., Irwin, R.J. (1997). Androgen modulation of the messenger ribonucleic acid of retinoic acid receptors in the prostate, seminal vesicles, and kidney in the rat. *Endocrinology* **138**: 553-559.

Imperato-McGinley, J., Binienda, Z., Arthur, A., Mininberg, D.T., Vaughan, E.D., Jr., Quimby, F.W. (1985). The development of a male pseudohermaphroditic rat using an inhibitor of the enzyme 5 alpha-reductase. *Endocrinology* **116**: 807-812.

Ito, M., Roeder, R.G. (2001). The TRAP/SMCC/Mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trends Endocrinol. Metab* **12**: 127-134.

Itoh, K., Antipova, A., Ratcliffe, M.J., Sokol, S. (2000). Interaction of dishevelled and Xenopus axin-related protein is required for wnt signal transduction. *Mol. Cell Biol.* **20**: 2228-2238.

Janulis, L., Grayhack J.T. (1999). *Endocrinology of the prostate*. pp. 58-68.

Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R.C., Ghafoor, A., Feuer, E.J., Thun, M.J. (2005). Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J. Clin.* **55**: 10-30.

Johnson F.P. (1920). The later development of the urethra in the male. *J. Urol.* **4**: 447-450.

Jornvall, H., Hoog, J.O. (1995). Nomenclature of alcohol dehydrogenases. *Alcohol Alcohol* **30**: 153-161.

Jost A. (1953). Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog. Horm. Res.* 379-385.

Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**: 403-414.

Katanaev, V.L., Ponzielli, R., Semeriva, M., Tomlinson, A. (2005). Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in *Drosophila*. *Cell* **120**: 111-122.

Kato, M. (2001). Frequent up-regulation of WNT2 in primary gastric cancer and colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* **19**: 1003-1007.

Kato, M., Hirai, M., Sugimura, T., Terada, M. (1996). Cloning, expression and chromosomal localization of Wnt-13, a novel member of the Wnt gene family. *Oncogene* **13**: 873-876.

Kirikoshi, H., Sekihara, H., Kato, M. (2001). Molecular cloning and characterization of human WNT7B. *Int. J. Oncol.* **19**: 779-783.

Kliwer, S.A., Umesono, K., Mangelsdorf, D.J., Evans, R.M. (1992). Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* **355**: 446-449.

Koh, S.S., Chen, D., Lee, Y.H., Stallcup, M.R. (2001). Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J. Biol. Chem.* **276**: 1089-1098.

Korzus, E., Torchia, J., Rose, D.W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* **279**: 703-707.

Kurokawa, R., Kalafus, D., Ogliastro, M.H., Kioussi, C., Xu, L., Torchia, J., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K. (1998). Differential use of CREB binding protein-coactivator complexes. *Science* **279**: 700-703.

Kwok, R.P., Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., Bachinger, H.P., Brennan, R.G., Roberts, S.G., Green, M.R., Goodman, R.H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* **370**: 223-226.

Kwon, H., Imbalzano, A.N., Khavari, P.A., Kingston, R.E., Green, M.R. (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature* **370**: 477-481.

Kyprianou, N., Isaacs, J.T. (1988). Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* **122**: 552-562.

Lamb, A.L., Newcomer, M.E. (1999). The structure of retinal dehydrogenase type II at 2.7 Å resolution: implications for retinal specificity. *Biochemistry* **38**: 6003-6011.

Lampron, C., Rochette-Egly, C., Gorry, P., Dollé, P., Mark, M., Lufkin, T., LeMour, M., Chambon, P. (1995). Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II



(CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* **121**: 539-548.

Lasnitzki, I., Goodman, D.S. (1974). Inhibition of the effects of methylcholanthrene on mouse prostate in organ culture by vitamin A and its analogs. *Cancer Res.* **34**: 1564-1571.

Le Douarin, B., Nielsen, A.L., Garnier, J.M., Ichinose, H., Jeanmougin, F., Losson, R., Chambon, P. (1996). A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* **15**: 6701-6715.

Lee, C., Tsai, Y., Sensibar, J., Oliver, L., Grayhack, J.T. (1986). Two-dimensional characterization of prostatic acid phosphatase, prostatic specific antigen and prostate binding protein in expressed prostatic fluid. *Prostate* **9**: 135-146.

Lehmann, J.M., Zhang, X.K., Pfahl, M. (1992). RAR gamma 2 expression is regulated through a retinoic acid response element embedded in Sp1 sites. *Mol. Cell Biol.* **12**: 2976-2985.

Leid, M., Kastner, P., Chambon, P. (1992). Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 427-433.

Leroy, P., Nakshatri, H., Chambon, P. (1991). Mouse retinoic acid receptor alpha 2 isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**: 10138-10142.

Leung, H.Y., Mehta, P., Gray, L.B., Collins, A.T., Robson, C.N., Neal, D.E. (1997). Keratinocyte growth factor expression in hormone insensitive prostate cancer. *Oncogene* **15**: 1115-1120.

Leventhal, P.S., Shelden, E.A., Kim, B., Feldman, E.L. (1997). Tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase during insulin-like growth factor-I-stimulated lamellipodial advance. *J. Biol. Chem.* **272**: 5214-5218.

Levin, M.S. (1993). Cellular retinol-binding proteins are determinants of retinol uptake and metabolism in stably transfected Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 8267-8276.

Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S., De Robertis, E.M. (1997). Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* **88**: 747-756.

Li, E., Sucov, H.M., Lee, K.F., Evans, R.M., Jaenisch, R. (1993). Normal development and growth of mice carrying a targeted disruption of the alpha 1 retinoic acid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**: 1590-1594.

Li, L., Yuan, H., Xie, W., Mao, J., Caruso, A.M., McMahon, A., Sussman, D.J., Wu, D. (1999). Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 129-134.

Li, M.T., Richter, F., Chang, C., Irwin, R.J., Huang, H. (2002). Androgen and retinoic acid interaction in LNCaP cells, effects on cell proliferation and expression of retinoic acid receptors and epidermal growth factor receptor. *BMC. Cancer* **2**: 16.

Lin, K., Wang, S., Julius, M.A., Kitajewski, J., Moos, M., Jr., Luyten, F.P. (1997). The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**: 11196-11200.

Liu, H., Mohamed, O., Dufort, D., Wallace, V.A. (2003). Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina. *Dev. Dyn.* **227**: 323-334.

Logan, C.Y., Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**: 781-810.

Lohnes, D., Dierich, A., Ghyselinck, N., Kastner, P., Lampron, C., LeMeur, M., Lufkin, T., Mendelsohn, C., Nakshatri, H., Chambon, P. (1992). Retinoid receptors and binding proteins. *J. Cell Sci. Suppl* **16**: 69-76.

Lohnes, D., Kastner, P., Dierich, A., Mark, M., LeMeur, M., Chambon, P. (1993). Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* **73**: 643-658.

Lopaczynski, W., Hruszkewycz, A.M., Lieberman, R. (2001). Preprostatectomy: A clinical model to study stromal-epithelial interactions. *Urology* **57**: 194-199.

Lufkin, T., Lohnes, D., Mark, M., Dierich, A., Gorry, P., Gaub, M.P., LeMeur, M., Chambon, P. (1993). High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**: 7225-7229.

Lung, B., Cunha, G.R. (1981). Development of seminal vesicles and coagulating glands in neonatal mice. I. The morphogenetic effects of various hormonal conditions. *Anat. Rec.* **199**: 73-88.

Luo, J., Pasceri, P., Conlon, R.A., Rossant, J., Giguere, V. (1995). Mice lacking all isoforms of retinoic acid receptor beta develop normally and are susceptible to the teratogenic effects of retinoic acid. *Mech. Dev.* **53**: 61-71.

MacLean, G., Abu-Abed, S., Dollé, P., Tahayato, A., Chambon, P., Petkovich, M. (2001). Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. *Mech. Dev.* **107**: 195-201.

Mader, S., Chen, J.Y., Chen, Z., White, J., Chambon, P., Gronemeyer, H. (1993). The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J.* **12**: 5029-5041.

Mangelsdorf, D.J., Umesono K., Evans R.M. (1994). In *The retinoids*, Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S., eds. New York. pp. 319-349.

Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., Glinka, A., Niehrs, C. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* **417**: 664-667.

Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H., III, Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., Wu, D. (2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cell* **7**: 801-809.

Masiello, D., Chen, S.Y., Xu, Y., Verhoeven, M.C., Choi, E., Hollenberg, A.N., Balk, S.P. (2004). Recruitment of beta-catenin by wild-type or mutant androgen receptors correlates with ligand-stimulated growth of prostate cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **18**: 2388-2401.

Massague, J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**: 597-641.

Matsubara, A., Kan, M., Feng, S., McKeehan, W.L. (1998). Inhibition of growth of malignant rat prostate tumor cells by restoration of fibroblast growth factor receptor 2. *Cancer Res.* **58**: 1509-1514.

Mattei, M.G., Riviere, M., Krust, A., Ingvarsson, S., Vennstrom, B., Islam, M.Q., Levan, G., Kautner, P., Zelent, A., Chambon, P., . (1991). Chromosomal assignment of retinoic acid receptor (RAR) genes in the human, mouse, and rat genomes. *Genomics* **10**: 1061-1069.

McCormick, D.L., Rao, K.V., Steele, V.E., Lubet, R.A., Kelloff, G.J., Bosland, M.C. (1999). Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by 9-cis-retinoic acid. *Cancer Res.* **59**: 521-524.

McInerney, E.M., Rose, D.W., Flynn, S.E., Westin, S., Mullen, T.M., Krones, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R.T., Assa-Munt, N., Milburn, M.V., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (1998). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev.* **12**: 3357-3368.

McNeal, J.E. (1988). Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* **12**: 619-633.

Michaelson, J.S., Leder, P. (2001). beta-catenin is a downstream effector of Wnt-mediated tumorigenesis in the mammary gland. *Oncogene* **20**: 5093-5099.

Miller, G.J., Stapleton, G.E., Ferrara, J.A., Lucia, M.S., Pfister, S., Hedlund, T.E., Upadhyay, P. (1992). The human prostatic carcinoma cell line LNCaP expresses biologically active, specific receptors for 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Cancer Res.* **52**: 515-520.

Miyoshi, K., Rosner, A., Nozawa, M., Byrd, C., Morgan, F., Landesman-Bollag, E., Xu, X., Seldin, D.C., Schmidt, E.V., Taketo, M.M., Robinson, G.W., Cardiff, R.D., Hennighausen, L. (2002). Activation of different Wnt/beta-catenin signaling components in mammary epithelium induces transdifferentiation and the formation of pilar tumors. *Oncogene* **21**: 5548-5556.

Miyoshi, Y., Iwao, K., Nagasawa, Y., Aihara, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., Nakamura, Y. (1998). Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Res.* **58**: 2524-2527.

Montplaisir, V., Lan, N.C., Guimond, J., Savineau, C., Bhat, P.V., Mader, S. (2002). Recombinant class I aldehyde dehydrogenases specific for all-trans- or 9-cis-retinal. *J. Biol. Chem.* **277**: 17486-17492.

Moras, D., Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 384-391.

Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275**: 1787-1790.

Mulholland, D.J., Cheng, H., Reid, K., Rennie, P.S., Nelson, C.C. (2002). The androgen receptor can promote beta-catenin nuclear translocation independently of adenomatous polyposis coli. *J. Biol. Chem.* **277**: 17933-17943.

Mulholland, D.J., Read, J.T., Rennie, P.S., Cox, M.E., Nelson, C.C. (2003). Functional localization and competition between the androgen receptor and T-cell factor for nuclear beta-catenin: a means for inhibition of the Tcf signaling axis. *Oncogene* **22**: 5602-5613.

Munoz, A., Zenke, M., Gehring, U., Sap, J., Beug, H., Vennstrom, B. (1988). Characterization of the hormone-binding domain of the chicken c-erbA/thyroid hormone receptor protein. *EMBO J.* **7**: 155-159.

Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H., Chambon, P. (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J.* **12**: 2349-2360.

Nagpal, S., Saunders, M., Kastner, P., Durand, B., Nakshatri, H., Chambon, P. (1992). Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell* **70**: 1007-1019.

Nagy, L., Thomazy, V.A., Heyman, R.A., Davies, P.J. (1998). Retinoid-induced apoptosis in normal and neoplastic tissues. *Cell Death. Differ.* **5**: 11-19.

Napoli, J.L. (2000). A gene knockout corroborates the integral function of cellular retinol-binding protein in retinoid metabolism. *Nutr. Rev.* **58**: 230-236.

Nelson, D.R. (1999). Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch. Biochem. Biophys.* **369**: 1-10.

Niederreither, K., Abu-Abed, S., Schuhbaur, B., Petkovich, M., Chambon, P., Dollé, P. (2002). Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. *Nat. Genet.* **31**: 84-88.

Niederreither, K., Subbarayan, V., Dollé, P., Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat. Genet.* **21**: 444-448.

Ong, D.E., MacDonald, P.N., Gubitosi, A.M. (1988). Esterification of retinol in rat liver. Possible participation by cellular retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein II. *J. Biol. Chem.* **263**: 5789-5796.

Orth, J., Christensen, A.K. (1977). Localization of <sup>125</sup>I-labeled FSH in the testes of hypophysectomized rats by autoradiography at the light and electron microscope levels. *Endocrinology* **101**: 262-278.

Peehl, D.M., Wong, S.T., Stamey, T.A. (1993). Vitamin A regulates proliferation and differentiation of human prostatic epithelial cells. *Prostate* **23**: 69-78.

Petrow, V. (1990). Dihydrotestosterone. In *The prostate as an endocrine gland*, W.E.Farnsworth, R.Ablin, eds. Fla. pp. 3-18.

Pfahl, M. (1993). Signal transduction by retinoid receptors. *Skin Pharmacol.* **6 Suppl 1**: 8-16.

Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., De Robertis, E.M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* **397**: 707-710.

Playford, M.P., Bicknell, D., Bodmer, W.F., Macaulay, V.M. (2000). Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**: 12103-12108.

Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* **14**: 1837-1851.

Quadro, L., Blaner, W.S., Salchow, D.J., Vogel, S., Piantedosi, R., Gouras, P., Freeman, S., Cosma, M.P., Colantuoni, V., Gottesman, M.E. (1999). Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J.* **18**: 4633-4644.

Rachez, C., Gamble, M., Chang, C.P., Atkins, G.B., Lazar, M.A., Freedman, L.P. (2000). The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes. *Mol. Cell Biol.* **20**: 2718-2726.

Rajah, R., Valentinis, B., Cohen, P. (1997). Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **272**: 12181-12188.

Ray, W.J., Bain, G., Yao, M., Gottlieb, D.I. (1997). CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family. *J. Biol. Chem.* **272**: 18702-18708.

Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* **378**: 681-689.

Rochette-Egly, C. (2003). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal.* **15**: 355-366.

Rochette-Egly, C., Adam, S., Rossignol, M., Egly, J.M., Chambon, P. (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIIF and phosphorylation by CDK7. *Cell* **90**: 97-107.

Rossant, J., Zirngibl, R., Cado, D., Shago, M., Giguere, V. (1991). Expression of a retinoic acid response element-hsplaZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* **5**: 1333-1344.

Rowan, B.G., Weigel, N.L., O'Malley, B.W. (2000). Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **275**: 4475-4483.

Ruan, W., Powell-Braxton, L., Kopchick, J.J., Kleinberg, D.L. (1999). Evidence that insulin-like growth factor I and growth hormone are required for prostate gland development. *Endocrinology* **140**: 1984-1989.

Ruberte, E., Dollé, P., Chambon, P., Morriss-Kay, G. (1991). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Development* **111**: 45-60.

Ruberte, E., Dollé, P., Krust, A., Zelent, A., Morriss-Kay, G., Chambon, P. (1990). Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis. *Development* **108**: 213-222.

Rubinfeld, B., Robbins, P., El Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., Polakis, P. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* **275**: 1790-1792.

Saitoh, T., Katoh, M. (2001). Molecular cloning and characterization of human WNT5B on chromosome 12p13.3 region. *Int. J. Oncol.* **19**: 347-351.

Shah, S., Hecht, A., Pestell, R., Byers, S.W. (2003). Trans-repression of beta-catenin activity by nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* **278**: 48137-48145.

Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A., Brown, M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* **103**: 843-852.

Shao, D., Lazar, M.A. (1999). Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J. Clin. Invest* **103**: 1617-1618.

Shibamoto, S., Higano, K., Takada, R., Ito, F., Takeichi, M., Takada, S. (1998). Cytoskeletal reorganization by soluble Wnt-3a protein signalling. *Genes Cells* **3**: 659-670.

Song, L.N., Herrell, R., Byers, S., Shah, S., Wilson, E.M., Gelmann, E.P. (2003). Beta-catenin binds to the activation function 2 region of the androgen receptor and modulates the effects of the N-terminal domain and TIF2 on ligand-dependent transcription. *Mol. Cell Biol.* **23**: 1674-1687.

Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**: 194-198.

Srinivas, H., Juroske, D.M., Kalyankrishna, S., Cody, D.D., Price, R.E., Xu, X.C., Narayanan, R., Weigel, N.L., Kurie, J.M. (2005). c-Jun N-terminal kinase contributes to aberrant retinoid signaling in lung cancer cells by phosphorylating and inducing proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha. *Mol. Cell Biol.* **25**: 1054-1069.

Sucov, H.M., Murakami, K.K., Evans, R.M. (1990). Characterization of an autoregulated response element in the mouse retinoic acid receptor type beta gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**: 5392-5396.

Sugimura, Y., Cunha, G.R., Donjacour, A.A. (1986). Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol. Reprod.* **34**: 961-971.

Sugimura, Y., Foster, B.A., Hom, Y.K., Lipschutz, J.H., Rubin, J.S., Finch, P.W., Aaronson, S.A., Hayashi, N., Kawamura, J., Cunha, G.R. (1996). Keratinocyte growth factor (KGF) can replace testosterone in the ductal branching morphogenesis of the rat ventral prostate. *Int. J. Dev. Biol.* **40**: 941-951.

Sulik, K.K., Dehart, D.B. (1988). Retinoic-acid-induced limb malformations resulting from apical ectodermal ridge cell death. *Teratology* **37**: 527-537.

Tago, K., Nakamura, T., Nishita, M., Hyodo, J., Nagai, S., Murata, Y., Adachi, S., Ohwada, S., Morishita, Y., Shibuya, H., Akiyama, T. (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev.* **14**: 1741-1749.

Tahayato, A., Dollé, P., Petkovich, M. (2003). Cyp26C1 encodes a novel retinoic acid-metabolizing enzyme expressed in the hindbrain, inner ear, first branchial arch and tooth buds during murine development. *Gene Expr. Patterns.* **3**: 449-454.

Taimi, M., Helvig, C., Wisniewski, J., Ramshaw, H., White, J., Amad, M., Korczak, B., Petkovich, M. (2004). A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **279**: 77-85.

Takemaru, K., Yamaguchi, S., Lee, Y.S., Zhang, Y., Carthew, R.W., Moon, R.T. (2003). Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature* **422**: 905-909.

Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P., He, X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**: 530-535.

Thompson J.N., Howell J.M., Pitt G.A. (1964). Vitamin A and reproduction in rats. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **159**: 510-535.

Timme, T.L., Yang, G., Rogers, E., Kadmon, D., Morganstern, J.P., Park, S.H., Thompson, T.C. (1996). Retroviral transduction of transforming growth factor-beta1 induces pleiotropic benign prostatic growth abnormalities in mouse prostate reconstitutions. *Lab Invest* **74**: 747-760.

Timms, B.G., Lee, C.W., Aumuller, G., Seitz, J. (1995). Instructive induction of prostate growth and differentiation by a defined urogenital sinus mesenchyme. *Microsc. Res. Tech.* **30**: 319-332.

Tora, L., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Gaub, M.P., Chambon, P. (1988). The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* **333**: 185-188.



Tuica, C.I., Byers, S., Gelmann, E.P. (2000). Beta-catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity. *Cancer Res.* **60**: 4709-4713.

Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C., Evans, R.M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* **65**: 1255-1266.

Uren, A., Reichsman, F., Anest, V., Taylor, W.G., Muraiso, K., Bottaro, D.P., Cumberledge, S., Rubin, J.S. (2000). Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **275**: 4374-4382.

van de Wetering, J., van der Hoeven, J.G., van Dijk, J.G., Meinders, A.E. (1997). When to stop treatment in comatose patients after successful cardiopulmonary resuscitation? A practical approach. *Neth. J. Med.* **51**: 91-95.

Verras, M., Sun, Z. (2004). {beta}-catenin Is Involved in Insulin-Like Growth Factor 1-Mediated Transactivation of the Androgen Receptor. *Mol. Endocrinol.*

Voegel, J.J., Heine, M.J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* **17**: 507-519.

Voeller, H.J., Tuica, C.I., Gelmann, E.P. (1998). Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res.* **58**: 2520-2523.

Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Luyten, F.P., Moos, M., Jr. (1997). Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* **88**: 757-766.

Wang, S.I., Parsons, R., Ittmann, M. (1998a). Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in a subset of prostate adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* **4**: 811-815.

Wang, X., Penzes, P., Napoli, J.L. (1996). Cloning of a cDNA encoding an aldehyde dehydrogenase and its expression in Escherichia coli. Recognition of retinal as substrate. *J. Biol. Chem.* **271**: 16288-16293.

Wang, Y.Z., Wong, Y.C. (1998b). Sex hormone-induced prostatic carcinogenesis in the noble rat: the role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of prostate cancer. *Prostate* **35**: 165-177.

Wehrli, M., Dougan, S.T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A., DiNardo, S. (2000). arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* **407**: 527-530.

- Wei, L.N. (2003). Retinoid receptors and their coregulators. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**: 47-72.
- White, J.A., Beckett-Jones, B., Guo, Y.D., Dilworth, F.J., Bonasoro, J., Jones, G., Petkovich, M. (1997). cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J. Biol. Chem.* **272**: 18538-18541.
- Wilkinson, D.G. (1992). Whole mount in situ hybridization of vertebrate embryos. In *In situ Hybridization: A Practical Approach*, D.G.Wilkinson, ed. Oxford Univ., New York. pp. 75-83.
- Wilson J.G., Barch S. (1949). Fetal death and maldevelopment resulting from maternal vitamin A deficiency in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **72**: 687-693.
- Wilson J.G., Roth C.B., Warkany J. (1953). An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. *Am. J. Anat.* **92**: 189-217.
- Wodarz, A., Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**: 59-88.
- Wolbach, S.B., Howe, P.R. (1925). Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *J. Exp. Med.* 753-777.
- Wu, S.F., Sun, H.Z., Qi, X.D., Tu, Z.H. (2001). Effect of epristeride on the expression of IGF-1 and TGF-beta receptors in androgen-induced castrated rat prostate. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* **226**: 954-960.
- Yang, F., Li, X., Sharma, M., Sasaki, C.Y., Longo, D.L., Lim, B., Sun, Z. (2002). Linking beta-catenin to androgen-signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **277**: 11336-11344.
- Yang, Z.N., Davis, G.J., Hurley, T.D., Stone, C.L., Li, T.K., Bosron, W.F. (1994). Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **18**: 587-591.
- Yao, T.P., Oh, S.P., Fuchs, M., Zhou, N.D., Ch'ng, L.E., Newsome, D., Bronson, R.T., Li, E., Livingston, D.M., Eckner, R. (1998). Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* **93**: 361-372.
- Yashiro, K., Zhao, X., Uehara, M., Yamashita, K., Nishijima, M., Nishino, J., Saijoh, Y., Sakai, Y., Hamada, H. (2004). Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb. *Dev. Cell* **6**: 411-422.

Yost, C., Torres, M., Miller, J.R., Huang, E., Kimelman, D., Moon, R.T. (1996). The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* **10**: 1443-1454.

Yuan, C.X., Ito, M., Fondell, J.D., Fu, Z.Y., Roeder, R.G. (1998). The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor- associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 7939-7944.

Zhang, X., Lee, C., Ng, P.Y., Rubin, M., Shabsigh, A., Buttyan, R. (2000). Prostatic neoplasia in transgenic mice with prostate-directed overexpression of the c-myc oncoprotein. *Prostate* **43**: 278-285.

Zhao, D., McCaffery, P., Ivins, K.J., Neve, R.L., Hogan, P., Chin, W.W., Drager, U.C. (1996). Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **240**: 15-22.

Zhao, X.Y., Ly, L.H., Peehl, D.M., Feldman, D. (1999). Induction of androgen receptor by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 9-cis retinoic acid in LNCaP human prostate cancer cells. *Endocrinology* **140**: 1205-1212.